

---

# **Charakterisierung der Phosphorylierung von c-Abl an Threonin<sup>735</sup> in *Helicobacter pylori*- infizierten Epithelzellen**

---



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Sabine Schneider

aus Frankfurt am Main

Berichterstatter: PD Dr. Arnulf Kletzin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Markus Engstler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Johannes Löwer

Tag der Einreichung: 13.07.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2012

Darmstadt 2012

D 17

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Helicobacter pylori</i>	4
2.1.1 Epidemiologie	4
2.1.2 Diagnose und Therapie	4
2.1.3 Pathogenese	5
2.1.4 Pathogenitätsfaktoren von <i>H. pylori</i>	7
2.1.4.1 Vakuolisierendes Zytotoxin A	8
2.1.4.2 <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel	9
2.1.4.3 Zytotoxin-assoziiertes Antigen A	11
2.1.4.4 CagA vermittelte Zellmotilität in <i>H. pylori</i> infizierten Epithelzellen	13
2.1.4.5 <i>H. pylori</i> -vermittelte Apoptose infizierten Epithelzellen	15
2.2 Die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl	16
2.2.1 Rolle von c-Abl als Protoonkogen	17
2.2.2 Struktur und Regulierung von c-Abl	17
2.2.3 Nukleares c-Abl und seine Funktion in der Zelle	20
2.2.4 Zytoplasmatisches c-Abl und seine Funktion in der Zelle	23
2.2.5 Zytoplasmatisches c-Abl und seine Funktion während einer <i>H. pylori</i> Infektion gastral-epithelialer Zellen	23
2.3 Zielsetzung	25
<b>3. Material</b>	<b>26</b>
3.1 Bakterien	26
3.2 Zellen	26
3.3 Plasmide	27
3.4 siRNA	27
3.5 Primer	28
3.6 Enzyme	28
3.6.1 Kinasen	28
3.6.2 Restriktionsenzyme	28
3.6.3 Ligasen und Polymerasen	28
3.7 Antikörper	29
3.8 Stimulanzien	30
3.9 Inhibitoren	30
3.10 Transfektionsreagenzien	31

3.11 Kits.....	31
3.12 Chemikalien.....	31
3.13 Lösungen, Medien, Puffer.....	33
3.14 Geräte.....	36
3.15 Computer und Software.....	37
<b>4. Methoden.....</b>	<b>38</b>
4.1 Zellbiologische Methoden.....	38
4.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen.....	38
4.1.2 Zellzählung.....	38
4.1.3 Reverse Transfektion von siRNA.....	38
4.1.4 Transiente Transfektion adhärenter Zellen.....	39
4.1.5 Etablierung von stabil transfizierten epithelialen Zelllinien.....	39
4.1.6 Behandlung der adhärenten Zellen mit Inhibitoren.....	40
4.1.7 Kultivierung von <i>H. pylori</i> .....	40
4.1.8 Anlegen von <i>H. pylori</i> Stammkulturen.....	41
4.1.9 Infektion von Zellen mit <i>H. pylori</i> .....	41
4.1.10 Stimulierung von Zellen.....	42
4.1.11 Zellmigrationsexperimente.....	42
4.1.12 Zellviabilitätsmessung.....	43
4.1.13 Bestimmung apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung und schließender Messung in einem Durchflusszytometer (FACS: Fluorescence-Activated Cell-Sorting).....	43
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	45
4.2.1 RNA-Isolierung.....	45
4.2.2 cDNA Synthese mittels RT-PCR.....	45
4.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	45
4.2.4 Gelelektrophorese von DNA.....	46
4.2.5 Gelextraktion von DNA.....	46
4.2.6 Vermehrung von Plasmid-DNA.....	47
4.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA.....	47
4.2.8 Mutagenese von Plasmid-DNA.....	47
4.2.9 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	48
4.2.10 Ligation von Plasmid DNA.....	49
4.3 Arbeiten mit Proteinen.....	50
4.3.1 Präparation von Gesamtzellextrakten.....	50
4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50

4.3.3 Immunpräzipitation.....	50
4.3.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
4.3.5 Sypro Ruby Färbung von SDS-Gelen.....	51
4.3.6 Western Blot.....	52
4.3.7 Immunfluoreszenzanalyse.....	52
4.3.8 Proteinexpression und Isolierung in <i>E. coli</i> .....	53
4.3.9 <i>In vitro</i> Phosphorylierung.....	54
4.3.10 Identifizierung von c-Abl Bindungspartnern mittels Tandem-Affinitäts- Aufreinigung.....	55
4.4 Bioinformatische Analysen zur Identifizierung der c-Abl an T <sup>735</sup> - phosphorylierenden Kinase.....	56
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
5.1 <i>H. pylori</i> induziert eine Phosphorylierung an c-Abl <sup>T735</sup> in gastralen Epithelzellen.....	57
5.2 Welche Threoninkinase bewirkt die <i>H. pylori</i> -induzierte Phosphorylierung an c-Abl <sup>T735</sup> in infizierten Epithelzellen?.....	64
5.2.1 PKC phosphoryliert c-Abl an Threonin <sup>735</sup> in <i>H. pylori</i> -infizierten gastralen Epithelzellen.....	65
5.2.2 PKC <sup>α</sup> und PKC <sup>β</sup> phosphorylieren c-Abl an Threonin <sup>735</sup> <i>in vitro</i> .....	73
5.3 Die <i>H. pylori</i> induzierte c-Abl <sup>T735</sup> Phosphorylierung wird durch bakterielles CagL des T4SS vermittelt.....	78
5.4 Die Phosphorylierung an c-Abl <sup>T735</sup> begünstigt die Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma infizierter Zellen.....	84
5.5 Aktivierung von c-Abl durch <i>H. pylori</i> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und PMA.....	91
5.6 <i>H. pylori</i> induziert Apoptose in human epithelialen Adenocarcinoma Zellen.....	93
5.7 Transfektion der c-Abl <sup>T735A</sup> Mutante erhöht die <i>H. pylori</i> -induzierte Apoptose in human epithelialen Adenocarcinoma Zellen.....	97
5.8 Transfektion der c-Abl <sup>T735A</sup> -Mutante erhöht die Induktion von Apoptose in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - jedoch nicht PMA-stimulierten human epithelialen Adenocarcinoma Zellen.....	103
5.9 Eine Inhibierung von PKCs vermindert die Zellviabilität <i>H. pylori</i> -infizierter human epithelialer Adenocarcinoma Zellen.....	105
5.10 Bakteriell CagL vermindert die <i>H. pylori</i> induzierte Apoptose in human epithelialen Adenocarcinoma Zellen.....	106
5.11 Eine Mutation an c-Abl <sup>T735</sup> zu Alanin <sup>735</sup> bewirkt eine Reduzierung der <i>H. pylori</i> - induzierten Zellmigration in infizierten AGS Zellen.....	108
5.12 c-Abl interagiert mit 14-3-3 in <i>H. pylori</i> -infizierten Epithelzellen.....	110

5.13 Identifizierung von c-Abl Bindungspartnern mittels Tandem-Affinitäts- Aufreinigung.....	114
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>118</b>
6.1 Die <i>H. pylori</i> -induzierte Phosphorylierung an c-Abl <sup>T735</sup> ist unabhängig von der Akkumulierung von c-Abl in infizierten gastralen Epithelzellen.....	119
6.2 Phosphoryliertes c-Abl <sup>T735</sup> lokalisiert vornehmlich im Zytoplasma <i>H. pylori</i> - infizierter Epithelzellen.....	121
6.3 Eine Infektion gastraler Epithelzellen mit <i>H. pylori</i> fördert die Interaktion von c-Abl und 14-3-3.....	123
6.4 <i>H. pylori</i> induziert Apoptose in gastralen Epithelzellen.....	125
6.4.1 Eine Phosphorylierung an c-Abl <sup>T735</sup> resultiert in einer Verzögerung der <i>H. pylori</i> -induzierten Apoptose infizierter Epithelzellen.....	126
6.5 Die Expression von c-Abl <sup>T735A</sup> inhibiert die <i>H. pylori</i> -induzierte Zellmigration infizierter gastraler Epithelzellen.....	128
6.6 Bakteriell es CagL ist essentiell für die <i>H. pylori</i> -induzierte Phosphorylierung an c-Abl <sup>T735</sup> und führt zu einer Verminderung <i>H. pylori</i> -induzierter Apoptose in infizierten gastralen Epithelzellen.....	130
6.7 PKC vermittelt die <i>H. pylori</i> induzierte Phosphorylierung an c-Abl <sup>T735</sup> in infizierten Epithelzellen.....	131
6.8 Abschließende Betrachtung und Ausblick.....	135
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>155</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>163</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>164</b>
<b>12. Publikationen.....</b>	<b>165</b>
<b>13. Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>166</b>

---

## 1. Zusammenfassung

---

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein verbreitetes Humanpathogen, das die Magenschleimhaut von ca. 50% der Weltbevölkerung besiedelt. Ohne Eradikation des Bakteriums durch eine antimikrobielle Therapie persistiert es ein Leben lang. Eine Infektion mit *H. pylori* kann zu der Entstehung schwerwiegender Krankheiten wie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren oder Magenkrebs führen. Die Entstehung solcher schwerwiegenden Krankheiten basiert auf dem Einfluss dieses Pathogens auf zelluläre Signalwege, die unter anderem eine vermehrte Zellmotilität, Zellproliferation oder eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Proliferation der infizierten Zellen bewirken. Studien haben eine Steigerung der Migration *H. pylori*-infizierter Zellen durch eine Aktivierung der nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Abl im Zytoplasma der Zellen gezeigt. C-Abl stellt ein zentrales Schalterprotein in der Regulierung von Apoptose und Zellmigration in Zellen dar, dessen Lokalisierung in der Zelle von entscheidender Bedeutung für seine Funktion ist. Eine Phosphorylierung von c-Abl an Threonin<sup>735</sup> (c-Abl<sup>T735</sup>) ermöglicht eine Bindung von c-Abl an dem zytoplasmatischen Bindeprotein 14-3-3 und verzögert bei einer Aktivierung der Tyrosin-Kinase dessen Translokation in den Zellkern und eine damit verbundene Induktion von Apoptose.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Einfluss von zytoplasmatischem c-Abl in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen auf Apoptose und Zellmigration untersucht. Der Fokus lag auf dem Einfluss der Phosphorylierung von c-Abl<sup>T735</sup> auf diese *H. pylori*-induzierten Prozesse und der Identifizierung der c-Abl<sup>T735</sup>-phosphorylierenden Threoninkinase in diesen Zellen.

Eine *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung von c-Abl<sup>T735</sup> wurde unter Verwendung eines anti-phospho-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers im Western Blot in allen drei untersuchten epithelialen Zelllinien nachgewiesen. Die zelluläre Auswirkung in Bezug auf Apoptose, Zellviabilität und Zellmigration wurde in Zellen dokumentiert, die jeweils ein c-Abl-Wildtyp (c-Abl<sup>wt</sup>) Protein oder dessen phosphorylierungsresistente Mutante c-Abl<sup>T735A</sup> über-exprimierten und mit *H. pylori* infiziert wurden. Laserskanmikroskopie zeigte, dass T<sup>735</sup>-phosphoryliertes c-Abl<sup>wt</sup> im Zytoplasma der *H. pylori*-infizierten Epithelzellen lokalisiert war, wohingegen die phosphorylierungsresistente c-Abl<sup>T735A</sup>-Mutante vornehmlich im Zellkern nachgewiesen wurde. Eine FACS-Analyse von c-Abl<sup>wt</sup>- und c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen wies nach *H. pylori*-Infektion deutlich mehr apoptotische Zellen in den c-Abl<sup>T735A</sup>- als in den c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen auf. Sechs Stunden nach Infektion der c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen mit MOI 50 wiesen diese im Vergleich zu den kontrollinfizierten Zellen sogar 6% weniger apoptotische Zellen auf, wohingegen die c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen 6% mehr apoptotische Zellen als deren Kontrolle aufwiesen. Eine *H. pylori*-Infektion der c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen mit MOI 100 nach 24 Stunden, apoptotische Zellen c-Abl<sup>wt</sup> 26% c-

Abl<sup>T735A</sup> 45%, und MOI 10 nach 48 Stunden, apoptotische Zellen c-Abl<sup>wt</sup> 51% c-Abl<sup>T735A</sup> 68%, zeigte den deutlichsten Unterschied in der Induktion von Apoptose zwischen c-Abl<sup>wt</sup>- und c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen. Das Ergebnis des FACS Apoptose-Assays wurde anhand eines Zellviabilitäts-Assays bestätigt. In einem Zellmigrations-Assay wurde nach 24-stündiger *H. pylori*-Infektion mit MOI 50 eine Erhöhung der Migration der c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen um das 4,3fache im Vergleich zu den c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen um das 2,5fache dokumentiert. Anhand der Apoptose-, Zellviabilitäts- und Zellmigrationsassays konnte erstmals eine antiapoptotische und promigratorische Funktion der *H. pylori*-induzierten T<sup>735</sup>-Phosphorylierung in infizierten Epithelzellen aufgezeigt werden. Ko-Immunpräzipitation von phosphoryliertem c-Abl mit dem zytoplasmatischen Bindeprotein 14-3-3 mit einem anti-c-Abl Antikörper und anschließender Detektion von 14-3-3 mit einem anti-14-3-3 Antikörper im Western Blot zeigte eine gesteigerte Interaktion beider Proteine nach Infektion gastraler Epithelzellen mit *H. pylori*. Auf bakterieller Ebene wurde eine Abhängigkeit der Phosphorylierung von dem Vorhandensein der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*), einem funktionellen T4SS und dem Adhäsin CagL mittels anti-phospho-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Der Grad der induzierten Phosphorylierung war unabhängig von den bakteriellen Pathogenitätsfaktoren CagA und VacA.

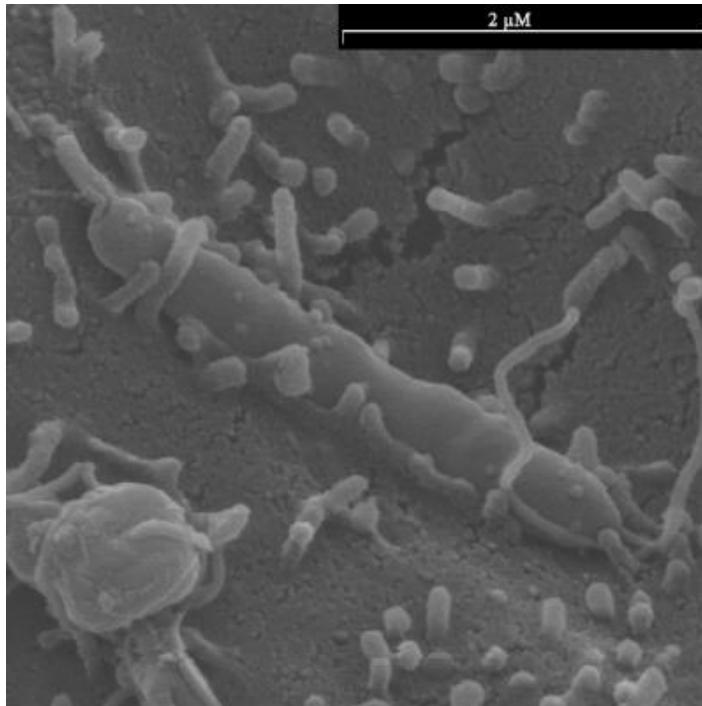
In vorangegangenen Studien war die zelluläre dual-spezifische Serin/Threonin-Thyrosin-Proteinkinase TTK als diejenige Kinase identifiziert worden, die c-Abl an T<sup>735</sup> zu phosphorylieren vermag. Die Ergebnisse der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion von c-Abl durch Proteinkinase C (PKC), der spezifische *knock down* von TTK und PKCs mittels siRNA und die Dokumentation der Aktivierung der PKC Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  mittels spezifischer Antikörper gegen aktiviertes PKC  $\alpha$  und  $\beta$  im Western Blot in dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung auf einer gesteigerten Aktivität der Proteinkinase C Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  der infizierten Zellen basiert.

Aufgrund dieser Beobachtungen ist es naheliegend, dass eine Interaktion von bakteriellem CagL mit Integrinen der Wirtszelle zu einer Aktivierung der Serin/Threoninkinasen PKC <sup>$\alpha$</sup>  und PKC <sup>$\beta$</sup>  führt. Die daraus resultierende Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> führt zu einer antiapoptotischen, prozellmigratorischen Reaktion der *H. pylori*-infizierten Zellen, basierend unter anderem auf einer Interaktion mit 14-3-3 und somit dem Zurückhalten von c-Abl im Zytoplasma der Zellen.

## 2. Einleitung

### 2.1 *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* ist ein 2-4 µm großes, spiralig-gewundenes, stäbchenförmiges gram-negatives Bakterium (Abb. 2.1), dessen optimale Lebensbedingungen in einem mikroaerophilen Milieu bei einem pH-Wert von 5,5-8 liegen (Sachs *et al.*, 2000). Taxonomisch gehört es der Klasse der Epsilonproteobakterien, Ordnung Campylobacterales, Familie der *Helicobacteraceae*, Gattung *Helicobacter*, Art *Helicobacter pylori* an. Zudem



**Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori*.** Die Skalierung entspricht 2 µm (W. Dreher, PEI)

unterteilt man die Gattung *Helicobacter* in zwei große Gruppen, die gastralen und die enterohepatischen *Helicobacter* Spezies, wobei *H. pylori* mit über 20 anderen Spezies zu der gastralen Gruppe zählt (Fox *et al.*, 2002). Isoliert wurde *H. pylori* erstmals 1983 von den beiden Australiern B. J. Marshall und J. R. Warren aus dem Magen eines Patienten mit chronischer Gastritis (Marshall und Warren 1984). In einem waghalsigen Eigenversuch zeigte Marshall die Infektiösität des Bakteriums *H. pylori*, indem er eine Suspension mit *H. pylori* trank und

den damit einhergehenden Krankheitsverlauf dokumentierte (Marshall *et al.*, 1985A; Marshall *et al.*, 1985B; Morris *et al.*, 1987). Das Resultat dieses Experimentes war die Entwicklung einer chronischen Gastritis, die mittels einer Magenbiopsie diagnostiziert wurde. Später bestätigten Warren und Marshall diese ersten Erkenntnisse in weiteren Experimenten durch Unterstützung freiwilliger Probanden (Morris *et al.*, 1991). Durch eine anschließende Antibiotika-Therapie erfolgte die Eradikation des Bakteriums in den Probanden (Van der Weyden *et al.*, 2005). Aufgrund ihrer Arbeiten zur Entdeckung des Bakteriums *H. pylori* und dessen Rolle in Gastritis und Ulkus-Erkrankungen wurden Marshall und Warren 2005 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (Abbott, 2005).



### 2.1.1 Epidemiologie

Das humanpathogene Bakterium *H. pylori* besiedelt den Magen von fast 50% der Weltbevölkerung, wobei besonders Menschen in Ländern mit niedrigen sozioökonomischen und hygienischen Standards eine Infektion mit *H. pylori* aufweisen (Parsonnet, 1998; Woodward *et al.*, 2000). Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Infektionsrate von Menschen mit *H. pylori* in Industrieländern bei circa 30% und in Entwicklungsländern bei rund 80% liegt (Konturek *et al.*, 2001). Eine Übertragung von *H. pylori* erfolgt in der Regel fäkal-oral oder oral-oral und persistiert bei ausbleibender Behandlung ein Leben lang (Malaty *et al.*, 1994; Allaker *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 1999; Parssonet *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2004). Neben Speichel konnte *H. pylori* in Erbrochenem, gastrischem Reflux und Kot von Patienten nachgewiesen werden (Ferguson *et al.*, 1993, 1999; Kabir, 2004). Eine Neuinfektion mit *H. pylori* findet vermehrt im Kindesalter und nur selten bei Erwachsenen statt (Hirschl, 1994). Neben den hygienischen und bakteriellen Faktoren begünstigen Stress, Ernährung, Alkohol, Rauchen und die genetische Prädispositionen der Menschen eine Infektion mit *H. pylori* und der damit verbundenen Ausbildung gastraler Krankheiten (Atherton, 2006).

### 2.1.2 Diagnose und Therapie

Eine *H. pylori* Infektion äußert sich zunächst in Übelkeit, Völlegefühl und Erbrechen. Treten diese Symptome länger anhaltend auf, erfolgt in den meisten Fällen eine Magenspiegelung mit anschließender Biopsie der Magenschleimhaut. Im Anschluss daran kann ein das Vorhandensein der Bakterien in einem Wachstumstest bestimmt werden. Neben dieser relativ unangenehmen invasiven Methode gibt es eine Reihe nicht-invasiver Diagnosetests. Eine Identifizierung von *H. pylori* kann über einen immunologischen Nachweis im Stuhl oder Blut durch mono- und polyklonale Antikörper oder einen serologischen Nachweis von *H. pylori*-spezifischen Antikörpern in Urin und Speichel stattfinden. Die am häufigsten angewandte Diagnosemethode ist jedoch der <sup>13</sup>C-Atemtest. Hierbei wird dem Patienten eine mit radioaktivem Harnstoff angereicherte Flüssigkeit verabreicht. Bei einer Infektion mit *H. pylori* bewirkt die Aktivität des bakteriellen Enzyms Urease die Freisetzung von markiertem CO<sub>2</sub>. Das CO<sub>2</sub> wird mit der Atemluft ausgeschiedenen, in einem Behälter aufgefangen und untersucht (Kimura *et al.*, 2006; Cirak *et al.*, 2007). Bei einem positiven Ergebnis des Atemlufttests ist eine Magenspiegelung meist unausweichlich, um eine direkte Identifikation des Bakteriums im Magen zu ermöglichen und mögliche Schädigungen zu erkennen.

Eine Therapie von *H. pylori* erfolgt in Form einer Tripel-Therapie, die auf der Wirkung zweier Antibiotika (zum Beispiel Amoxicillin und Metronidazol) und einem Protonenpumpenhemmer (zum Beispiel Omeprazol) basiert (Megraud und Lamouliatte, 2003). Zudem wird intensiv an der Herstellung von Impfstoffen gegen *H. pylori* geforscht.

### 2.1.3 Pathogenese

Eine *H. pylori* Infektion verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch und nur 10% der Betroffenen weisen eine Symptomatik auf. Zudem können die Symptome einer Infektion durch eine vorangegangene Reizung des Magenepithels aufgrund der oben genannten Lebensumstände verstärkt werden. Besteht eine Infektion des Magenepithels mit *H. pylori*, kann diese mit unterschiedlichen Krankheitsbildern wie akuter und chronischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, MALT-Lymphome (*mucosa-associated lymphoid tissue*) oder Magenkrebs einhergehen. Obwohl sie in 90% der Fälle asymptomatisch verläuft, konnte ein enger Zusammenhang zwischen einer *H. pylori* Infektion und der Entstehung von Magenkrebs gezeigt werden (Blaser und Atherton, 2004). Demnach erhöht sich die Wahrscheinlichkeit an Magenkrebs zu erkranken etwa um das Sechsfache. Magenkrebs stellt die vierthäufigste Krebserkrankung auf der Welt dar und ist am weitesten in ostasiatischen und südamerikanischen Ländern verbreitet (Parkin *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Tatsachen wurde *H. pylori* 1994 von der Weltgesundheitsbehörde WHO (*World Health Organization*) als Klasse I Karzinogen deklariert (*International Agency for Research on Cancer*, 1994).

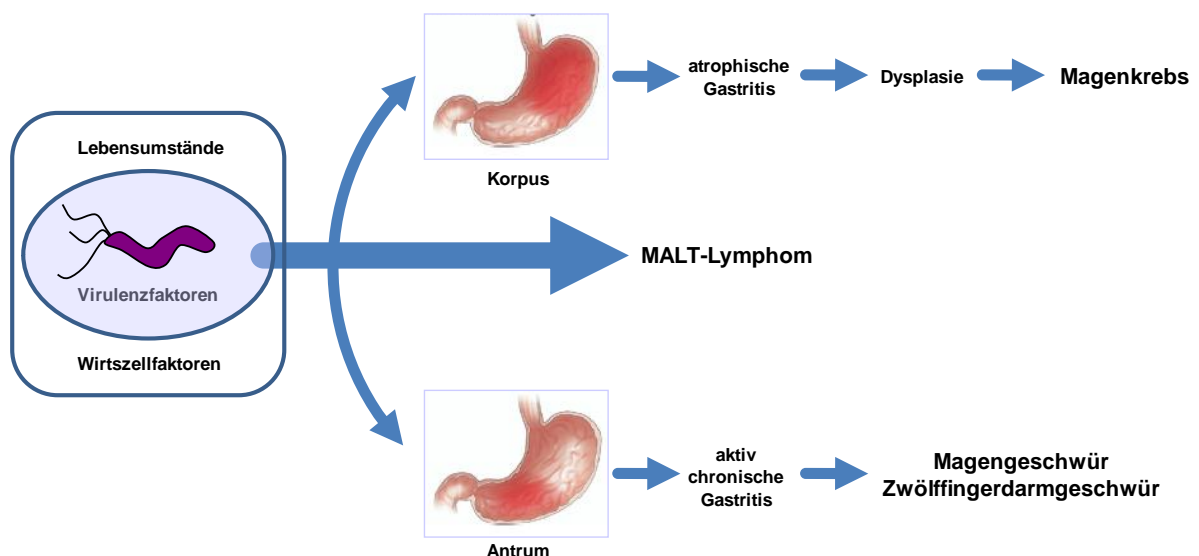
Eine Besiedelung des gastralen Epithels mit *H. pylori* führt zu einer anfänglichen Endzündungsreaktion, einer akuten Gastritis. In diesem Zusammenhang erfolgt eine Infiltration des infizierten Gewebes mit den Immunzellen T1-Helferzellen, Leukozyten und mononuklearen Makrophagen aus dem umliegenden Gewebe, ausgelöst durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 IL-8 und MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*) der *H. pylori* infizierten Zellen des Magenepithels (Akhiani *et al.*, 2002; D'Elia *et al.*, 1997; Smythies *et al.*, 2000; Dunn *et al.*, 1997). Neben der Immunreaktion bewirkt eine Infektion des Magenepithels mit *H. pylori* eine Veränderung der Magenphysiologie und resultiert in einer vermehrten Sekretion des Peptid-Hormons Gastrin, was eine gesteigerte Produktion von Magensäure bewirkt (Calam, 1999). Bei fortwährender Infektion des Magenepithels mit *H. pylori* kann dies zur Ausbildung einer chronischen Gastritis führen.

Bei Menschen mit einer intakten Säuresekretion besiedelt *H. pylori* meist den antralen Bereich des Magens, da sich dort eine verminderte Dichte säuresekreterischer Drüsengewebes befindet, wohingegen eine reduzierte Säuresekretion zur Kolonisierung des Magen-Korpus führt. Solche partiellen Unterschiede der Besiedelung des Magenepithels mit *H. pylori* resultierten nach bestehender akut chronischer Gastritis in der Ausbildung unterschiedlicher Krankheitsbilder (Abb. 2. 2) (Kuipers *et al.*, 1995).

In 10-20% der Fälle folgt auf eine aktiv chronische Gastritis des Antrums, die mit der beschriebenen Erhöhung der Säureproduktion und Pepsinsekretion einher geht, eine Schädigung des gastralen Epithels des Antrums und des daran anschließenden Epithels des

Zwölffingerdarms (*duodenum*). Das geschädigte Gewebe des Zwölffingerdarms wird teilweise durch gastrales Gewebe ersetzt und resultiert bei fortschreitender *H. pylori* Infektion in der Ausbildung eines Zwölffingerdarmgeschwürs (*ulcus duodenum*). Auch eine anhaltende Infektion des Antrums kann bei weiterer Schädigung zu einem Magengeschwür führen. Das Auftreten von Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüren ist zu über 80% mit dem Vorhandensein von *H. pylori* assoziiert (Kuipers *et al.*, 1995; Schultze *et al.*, 1998).

Eine aktiv chronische Gastritis kann zudem eine Ansammlung von zu Plasmazellen gereiften B-Zellen bewirken und zu einem Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Gewebe (*MALT - mucosa associated lymphoid tissue*) des Magens führen. Hält dieser Zustand für eine längere Zeit an, so kommt es zur Entstehung eines MALT-Lymphoms, das in frühen Stadien noch durch eine einfache Therapie gegen *H. pylori* zurückgebildet werden kann. Zu späteren Zeitpunkten hilft meist nur noch eine Chemotherapie (Kusters *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005).



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung von Faktoren, die zur Pathogenese einer *H. pylori* Infektion beitragen.** Lebensumstände, Wirtszellfaktoren und *H. pylori* Virulenzfaktoren tragen zur Ausbildung einer chronischen Gastritis des Magens bei, die zu einer Ausbildung des MALT-Lymphoms führen kann. Betrifft die Infektion die Korpus (rot) des Magens, führt dies zu einer atrophischen Gastritis, Dysplasie und langfristig Magenkrebs. Findet eine Infektion des Antrums (rot) des Magens statt, kann dies in einer aktiv chronischen Gastritis und final zur Ausbildung eines Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwürs führen (aus Kusters, 2006; Amieva und El-Omar, 2008 modifiziert).

Eine fortwährende *H. pylori* Infektion des Korpus resultiert oft in einer Atrophie des Drüsengewebes, vermindert somit die Säureproduktion des Magens und es kommt zu einer atrophischen Gastritis. Erfolgt nun bei dem Wiederaufbau des Epithels der teilweise Ersatz des Drüsengewebes durch intestinales Gewebe, führt dies zu einer intestinalen Metaplasie und stellt längerfristig als Dysplasie (Abweichung der Gewebestruktur vom Normalbild) eine Vorstufe zur Entstehung von Magenkrebs dar. Eine persistierende Infektion mit *H. pylori* führt in 2% der infizierten Patienten zur Entstehung von Magenkrebs (Peek und Blaser, 2002; Peek, 2005).

### 2.1.4 Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*

„*H. pylori* besitzt eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren (Tabelle 2.1), die es dem Bakterium ermöglichen, diese gastrische Nische erfolgreich zu besiedeln. Durch die Sekretion des Enzyms Urease vermag das Bakterium der Säure des Magens für kurze Zeit zu widerstehen. Diese enzymatische Reaktion basiert auf der Spaltung von Harnstoff in Ammonium und Bicarbonat. Ammonium dient dem Bakterium einerseits als Puffer gegen den niedrigen pH-Wert, andererseits stellt es eine Stickstoffquelle für dessen Aminosäuresynthese dar (Harris *et al.*, 1996; McGee und Mobley, 1999; Stingl *et al.*, 2002). Neben der Urease beinhaltet *H. pylori* knapp 300 Gene, die für weitere säureregulierende Proteine kodieren (Wen *et al.*, 2003).

**Tabelle 2.1: Ausschnitt von *H. pylori* Pathogenitätsfaktoren**

Virulenzfaktor	Funktion	Verbreitung	Referenz
Flagellen	Motilität	alle Stämme	Suerbaum, 1995
LPS	geringe Toxizität	alle Stämme	Moran <i>et al.</i> , 1997
Lewis xy Antigene	molekulare Mimikry, Immuntoleranz	einige Stämme	Appelmelk <i>et al.</i> , 1997
BabA2	Adhäsion für Le <sup>b</sup> (Lewis b Blutgruppen Antigen)	Typ I Stämme	Ilver <i>et al.</i> , 1998
AlpA und -B ( <i>adherence-associated lipoprotein</i> )	Anheftung an Wirtszellen	alle Stämme	Odenbreit <i>et al.</i> , 2002
Oip ( <i>outer inflammatory protein</i> )	Anheftung an Wirtszellen	alle Stämme	Yamaoka <i>et al.</i> , 2000
SabA ( <i>sialic acid-binding adhesin</i> )	Anheftung an Sialylsäure-Glykokonjugat Lewis x	alle Stämme	Mahdavi <i>et al.</i> , 2002
HP-NAP ( <i>neutrophil activating protein</i> )	Aktivierung von Neutrophilen	alle Stämme	Evans <i>et al.</i> , 1995
IceA	Homolog von NIA III Restriktions- Endonuklease	einige Stämme	Peek <i>et al.</i> , 1998
Urease	Puffern der Magensäure	alle Stämme	Harris <i>et al.</i> , 1996; McGee und Mobley, 1999
AhpC (Alkyl Hydroperoxid Reduktase)	Schutz gegen oxidativen Stress hervorgerufen durch eine aktive Immunantwort	alle Stämme	Olczak <i>et al.</i> , 2003
KatA (Katalase)	Schutz gegen oxidativen Stress hervorgerufen durch eine aktive Immunantwort	alle Stämme	Harris <i>et al.</i> , 2002
SodB (Superoxid Dismutase)	Schutz gegen oxidativen Stress hervorgerufen durch eine aktive Immunantwort	alle Stämme	Seyler <i>et al.</i> , 2001
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin	alle Stämme	Telford <i>et al.</i> , 1998; Lupetti <i>et al.</i> , 1996
CagA	Immundominantes Antigen	Typ I Stämme	Covacci <i>et al.</i> , 1998

Unter Einsatz seiner 4-6 unipolaren Flagellen überwindet *H. pylori* die viskose Schleimschicht des Magens und schwimmt in Richtung der pH-neutralen Mukosa. Die Orientierung erfolgt dabei entlang des steigenden pH-Wertes mittels Chemotaxis (Schreiber *et al.*, 2004).

An dem gastralen Epithel angekommen, stehen *H. pylori* eine Reihe von Adhäsionsmolekülen zur Verfügung, die ihm das Anheften an die gastralen Epithelzellen ermöglichen. Ein besonders gut charakterisiertes Adhäsionsmolekül stellt das 78 kDa große BabA2 (*blood group antigen-binding adhesin*) Protein dar. Es vermittelt die Bindung des Bakteriums an fukosylierte Le<sup>b</sup> (Lewis b) Blutgruppen-Antigene humaner Wirtszellen (Boren *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998). Ein weiteres wichtiges Adhäsion stellt das OipA (*outer inflammatory protein*) Protein dar. Das Vorhandensein von OipA bewirkt zudem die Ausschüttung von IL-8 der infizierten Epithelzellen. Auf diese Weise begünstigt es die Entstehung von Ulzera durch eine vermehrte Infiltration des Epithels mit Immunzellen (Yamaoka *et al.*, 2000). Neben diesen Adhäsionsmolekülen besitzt *H. pylori* Lipopolysaccharide (LPS), von denen viele eine Fukosylierung an Oligosaccharid-Antigenen tragen, die der von humanen Blutgruppen-Antigenen ähneln. Diese bakteriellen Lewis x und Lewis y Antigene ermöglichen *H. pylori* eine Art Tarnung, durch die es sich einer möglichen Immunantwort zu entziehen vermag (Appelmelk *et al.*, 1997).

Neben vielen weiteren besitzt *H. pylori* zwei besonders gut untersuchte Pathogenitätsfaktoren, die für die Ausbildung einer Infektion äußerst wichtig sind: das vakuolisierende Zytotoxin A (VacA) und das Zytotoxin assoziierte Antigen A (CagA). Anhand klinischer Studien konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit VacA- und CagA-positiven *H. pylori*-Stämmen mit einem erhöhten Vorkommen von peptischen Ulzera und Magenkrebs assoziiert ist (Weel *et al.*, 1996). Obwohl fast alle *H. pylori* Stämme das *vacA*-Gen besitzen, wird das Protein nur von circa 50% der Stämme sezerniert“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007).

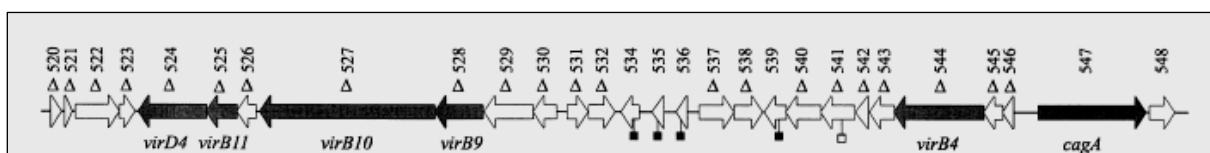
#### 2.1.4.1 Vakuolisierendes Zytotoxin A

„Das 140 kDa große VacA Protoxin wird vor seiner Sekretion durch Spaltung in ein circa 90 kDa großes, reifes Toxin überführt (Schmitt und Haas, 1994). Dies ist durch dessen Sekretion über einen Autotransporter oder Typ V Sekretionsmechanismus bedingt (Fischer *et al.*, 2001; Telford *et al.*, 1994). Das von Leunk (1988) erstmals beschriebene VacA Protein ist an einer Reihe von Wirtszellmodulationen beteiligt, wobei besonders der Effekt dieses Proteins auf gastrale Epithelzellen sehr detailliert untersucht wurde. Neben EGFR (*epithelial growth factor receptor*) und RPTPs (Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen) bindet VacA an GPI-APs (Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine) und bewirkt somit eine Internalisierung des Proteins über Lipidaggregate (*lipid rafts*) der Zellmembran in die Zelle (Kuo und Wang, 2003; Schraw *et al.*, 2002; Atherton, 2006). Die N-terminale Region von VacA formt einen Anionen-selektiven Chlorid-Kanal in der Lipidmembran, was zu einer drastischen Störung des osmotischen Gleichgewichtes der Zelle führt (Papini *et al.*, 1998; Szabo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004). Oft erfolgt zudem eine endozytotische Aufnahme des

Proteins in die Wirtszelle und führt bei einer Insertion in innere Membranstrukturen wie der Endosomenmembran zu einem Anschwellen der endosomatischen Vakuolen und damit zur Zerstörung des betroffenen gastralen Gewebes (Ricci *et al.*, 2000; Molinari *et al.*, 1997). Neben dieser Membranbindung wurde eine Akkumulation von zytosolischen VacAs in der inneren Mitochondrienmembran beobachtet. Dies führt zu einer Aktivierung von Kanälen in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran und einer damit verbundenen Ausschüttung von Cytochrom *c* in das Zytosol. Im Zytosol bewirkt Cytochrom *c* eine Aktivierung der Caspase-3-abhängigen Apoptose-Signalkaskade (Galmiche *et al.*, 2000; Kuck *et al.*, 2001). Unabhängig von dem mitochondrialen wurden weitere Signalwege beschrieben, über die VacA in AGS Zellen Apoptose-induzierend oder auch -inhibierend wirkt (Peek und Blaser, 2002 Review). Es interferiert mit dem Vesikeltransport, verhindert den Abbau von endozytiertem *H. pylori* oder inhibiert die Zellproliferation (Satin *et al.*, 1997; Papini *et al.*, 1998; Ricci *et al.*, 1996). Auch ein inhibierender Einfluss von VacA auf das Immunsystem wird diskutiert. Es blockiert die Prozessierung und Präsentation von Antigenen gegenüber B- und CD4<sup>+</sup> T-Zellen und wirkt störend auf eine auf der Aktivierung von T-Zellen basierende Immunantwort des Wirtes (Molinari *et al.*, 1998). Neben diesen immunmodulatorischen Effekten wurde VacA mit dem Lösen der TJ (*tight junctions*) von *H. pylori*-infizierten Zellen in Verbindung gebracht (Wang *et al.*, 2008)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007).

#### 2.1.4.2 *cag*-Pathogenitätsinsel

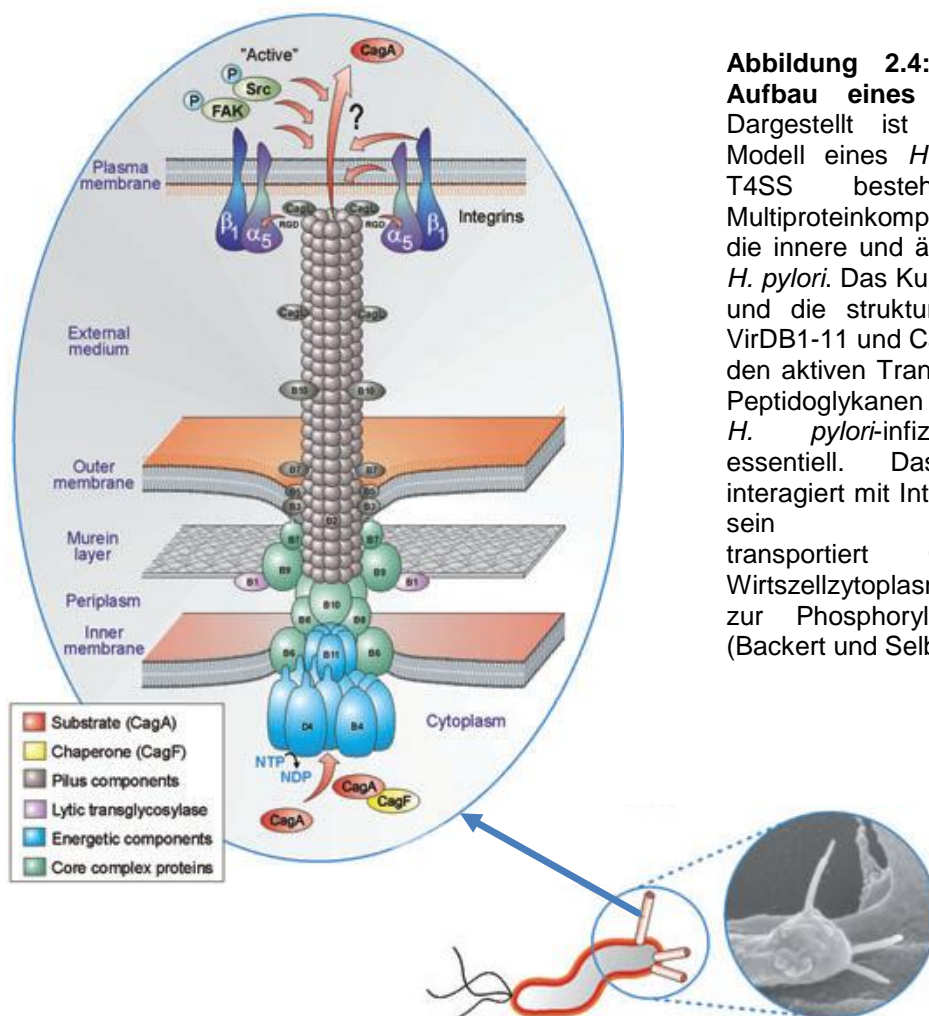
„In *in vitro* Experimenten wurde neben dem Pathogenitätsfaktor VacA ein zweiter Faktor mit einer stark erhöhten Virulenz von *H. pylori* in Verbindung gebracht. Es handelt sich hierbei um das 125-145 kDa große CagA Protein (siehe Abschnitt 2.1.4.3 und 2.1.4.3). Dieses stark immunogene Protein wird von dem *cagA* Gen kodiert und ist in 70-80% aller *H. pylori* Stämme vorhanden (Covacci *et al.*, 1993; Ching *et al.*, 1996; Cover *et al.*, 1995; Tummuru *et al.*, 1993). Das *cagA*-Gen liegt in einem speziellen 40 kb großen Genabschnitt, der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*).



**Abbildung. 2.3:** Schematische Darstellung der *cagPAI* des *H. pylori* Stammes *Hp 26695* (Fischer *et al.*, 2001).

Stämme, die eine *cagPAI* aufweisen, gehören der virulenteren Typ I Kategorie an und werden als CagA<sup>+</sup> (CagA-positiv) bezeichnet, wohingegen CagA<sup>-</sup>-Stämme (CagA-negativ) der Typ II Kategorie zugeschrieben werden (Tabelle 2.1). In Abhängigkeit von dem

jeweiligen *H. pylori* Stamm kodiert die *cagPAI* zwischen 27 und 31 Proteine, von denen 18 an dem Aufbau eines Typ IV Sekretionssystems beteiligt sind (T4SS; Abb. 2.3; Akopyants *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996; Covacci *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2001). Über diesen Membran-assoziierten Transportkomplex, der eine Nadel-ähnliche Struktur innehat, injizieren Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle in verschiedene Akzeptorzellen (Abb. 2.4). Sie sind in diversen pathogenen Bakterien an horizontalem DNA-Transfer zu eu- oder prokaryotischen Zellen, DNA-Aufnahme oder -Abgabe aus und in extrazelluläres Medium, Toxin-Sekretion oder der Injektion von Virulenzfaktoren in Wirtszellen beteiligt (Bacon *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2000)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Das T4SS von *H. pylori* beinhaltet 11 der charakteristischen *virB* Gene (*virB1-virB11*) und das für das VirD4 Protein (Translokase) kodierende Gen. Diese Gene sind auf der *cagPAI* von *H. pylori* lokalisiert. Es ist daher nicht verwunderlich, dass einige T4SS kodierende Gene der *cagPAI* von *H. pylori* denen von *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, und *Escherichia coli* homolog sind (Covacci *et al.*, 1999; Winans *et al.*, 1996; Backert und Meyer, 2006; Fronzes *et al.*, 2009).



**Abbildung 2.4: Modell für den Aufbau eines *H. pylori* T4SS.** Dargestellt ist ein hypothetisches Modell eines *H. pylori* T4SS. Das T4SS besteht aus einem Multiproteinkomplex und durchspannt die innere und äußere Membran von *H. pylori*. Das Kupplungsprotein VirD4 und die strukturellen Komponenten VirDB1-11 und CagL am Pilus sind für den aktiven Transport von CagA und Peptidoglykanen in das Zytoplasma *H. pylori*-infizierter Wirtszellen essentiell. Das CagL Protein interagiert mit Integrinrezeptoren über sein RDG-Bindungsmotiv, transportiert CagA in das Wirtszellzytoplasma und aktiviert Src zur Phosphorylierung von CagA (Backert und Selbach, 2008).

Die Ausbildung des Pilus des T4SS wird über den Kontakt von *H. pylori* mit der Wirtszelle initiiert. Im Anschluss daran sezerniert *H. pylori* in einem ATP-abhängigen Prozess über den Pilus des T4SSs den Pathogenitätsfaktor CagA, Peptidoglykane und gegebenenfalls noch unbekannte bakterielle Faktoren in die Wirtszellen (Asahi *et al.*, 2000; Backert *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Viala *et al.*, 2004). Peptidoglykane spielen in der Induktion proinflammatorischer Prozesse eine wichtige Rolle. „So kann eine Translokation von Peptidoglykanen, denen Muramin anhaftet, in Wirtszellen eine Aktivierung zytoplasmatischer Pathogen-Erkennungsmoleküle in diesen Zellen bewirken, die denen von Pflanzenzellen homolog sind (Viala *et al.*, 2004). Nod1 (*nodulation factor1*) und Nod2 (*nodulation factor2*) sind zwei dieser zellulären Moleküle, die auf bakterielles Peptidoglykan in Zellen reagieren (Chamaillard *et al.*, 2003; Giardian *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang konnte in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen eine Aktivierung von zellulärem Nod1 und eine daraus resultierende NF- $\kappa$ B-abhängige (*nuclear factor kappa B*) proinflammatorische Reaktion der Zellen nachgewiesen werden (Viala *et al.*, 2004). Diese kann maßgeblich zu einer von *H. pylori* induzierten Entzündungsreaktion beitragen“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007).

#### 2.1.4.3 Zytotoxin-assoziiertes Antigen A

„Ein weitaus besser charakterisierter Pathogenitätsfaktor in einer *H. pylori*-Infektion ist das CagA Protein. Es ist das bis jetzt einzig beschriebene *H. pylori* Effektorprotein, welches einen direkten Einfluss auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Wirtszellen hat. Eine Translokation von CagA ist jedoch abhängig von der Bindung des *H. pylori* Adhäsins CagL an der Spitze des T4SS-Pilus an  $\alpha_5\beta_1$  Integrine der Wirtszelloberfläche (Kwok *et al.*, 2007). Eine solche Injektion von CagA führt zu dem charakteristischen *Hummingbird*-Phänotyp, der zum einen eine starke Elongation und zum anderen eine gesteigerte Motilität, das sogenannte *Scatter*, der infizierten Zellen zur Folge hat (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001; Moese *et al.*, 2004). Diese Prozesse basieren partiell auf einer Tyrosin-Phosphorylierung an C-terminalen EPIYA-Motiven (Glutaminsäure (E), Prolin (P), Isoleucin (I), Tyrosin (Y), Alanin (A)) des translozierten CagA durch Src (*rous sarcoma virus kinase*) Familie-Kinasen (SFKs) und Abl Tyrosinkinasen im Zytoplasma der Wirtszellen (Stein *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2002; Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). EPIYA-Motive stellen einen Bereich von Sequenzwiederholungen dar, deren Hauptmerkmal eine aus den fünf Aminosäuren Glutaminsäure (E), Prolin (P), Isoleucin (I), Tyrosin (Y) und Alanin (A) bestehende Konsensus-Sequenz ist. Je nach *H. pylori*-Stamm kann diese EPIYA-Konsensus Sequenz drei- bis sechsmal in einem CagA Protein vorkommen und trägt somit zu Größenschwankungen des Proteins von 125-145 kDa bei (Hatakeyama, 2003). Unterteilt werden die EPIYA-Motive in EPIYA-A, -B, -C und -D, wobei



sich diese durch ihre flankierenden Sequenzen voneinander unterscheiden. In westlichen Ländern kommt vor allem CagA, auch *western CagA* genannt, mit einer Kombination aus EPIYA-A, -B und -C vor, wobei die EPIYA-A und -B Sequenz einmal und die EPIYA-C Sequenz ein- bis dreimal innerhalb eines *western Cag* Proteins vorhanden sein kann (Hatakeyama, 2003). Dies ist wahrscheinlich auf homologe Rekombination der entsprechenden Gensequenz zurückzuführen. Zudem erfährt die EPIYA-C Sequenz einen höheren Grad an Tyrosin- Phosphorylierung in *H. pylori*-infizierten Epithelzellen (Higashi *et al.*, 2002; Naito *et al.*, 2006). EPIYA-Motive des *east asian CagA* Typs kommen hauptsächlich in Asien vor und weisen vermehrt eine Kombination der EPIYA-A, -B und -D Sequenz auf. Zudem wird das Vorhandensein von *east asian CagA* mit einer erhöhten Kanzerogenität in Verbindung gebracht (Higashi *et al.*, 2002; Hatakeyama *et al.*, 2004). Transloziertes CagA stellt eine Art „eukaryotisches Adaptermolekül“ in infizierten Zellen dar. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Studie mit transgenen *Drosophila melanogaster*, in denen gezeigt wurde, dass systemisches CagA die Funktion von Gab Proteinen (*Grb2-associated binder*) unter Bindung an SHP2 (*Src-homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase*) übernehmen kann (Botham *et al.*, 2008; Hatakeyama *et al.*, 2003). Bislang sind rund 20 zelluläre Proteine identifiziert worden, mit denen CagA interagiert. Hierbei lassen sich die Interaktionen des bakteriellen CagA mit Proteinen der Wirtszelle in CagA Phosphotyrosin-abhängige und -unabhängige Interaktionen unterteilen (Backert *et al.*, 2010).

Phosphotyrosin-unabhängige Interaktionen von CagA mit Wirtszellproteinen wurden mit einer Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen, Störung der Zellpolarität, einer vermehrten Proliferation und Inflammation und einer gesteigerten Zellmotilität und -elongation in Verbindung gebracht. So führt eine Infektion epithelialer Zellen mit *H. pylori* zur Zerstörung von Zell-Zell-Kontakten wie TJs (*tight junctions*) und AJs (*adherens junctions*), welche für die Aufrechterhaltung der Membranintegrität des gastralen Epithels essentiell sind. Dies basiert zum einen auf der Assoziation von CagA mit dem TJ Scaffolding Protein ZO-1 (*zonula occludens-1*) und dem Transmembran Protein JAM (*junctional adhesion molecule*) (Amieva *et al.*, 2003; Bagnoli *et al.*, 2005). Zum anderen interagiert CagA mit dem Zell-Zell-Adhäsionsprotein E-Cadherin, was zur Zerstörung der AJ polarisierter Epithelzellen und zudem zu einer gesteigerten Transkription mitogener Gene durch eine Akkumulierung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern *H. pylori*-infizierter Zellen führt (Murata-Kamiya *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2005). Desweiteren wurde eine Interaktion von CagA mit den zellulären Signalmolekülen c-Met (*hepatocyte growth factor receptor*), Phospholipase PLC- $\gamma$ , Par1 (*partitioning-defective 1*), Tak1 (*transforming growth factor-beta-activated kinase 1*) Src, c-Abl (Abelson Kinase) und Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) gezeigt (Backert *et al.*, 2010). Grb2 wurde als erstes zelluläres Signalmolekül identifiziert, das mit CagA interagiert und ist von allen 20

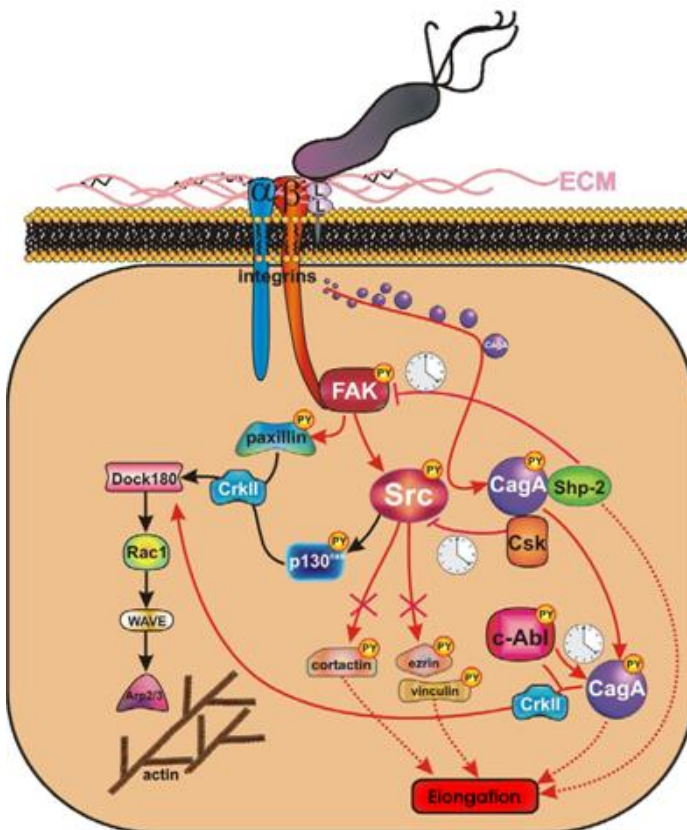
zellulären CagA Interaktionspartnern das einzige Protein, das sowohl mit unphosphoryliertem als auch phosphoryliertem CagA interagiert (Mimuro *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2009). Dies resultiert in beiden Fällen in einer Aktivierung der nachgeschalteten Ras (*rat sarcoma protein*) → Raf (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog*) → Mek (*MAPK/ERK kinase*) → ERK (*extracellular signal-related kinase*) Signalkaskade und nimmt somit Einfluss auf Zellproliferation, Inflammation, Zellmotilität und -elongation (Mimuro *et al.*, 2002). Erst kürzlich wurde eine Interaktion von CagA mit dem Apoptose-stimulierenden Protein2 von p53 (ASPP2) nachgewiesen (Buti *et al.*, 2011). Dies führt zu einer vermehrten Bindung von ASPP2 und p53 und fördert so den vermehrten Abbau von p53 durch das Proteasomensystem in *H. pylori*-infizierten Zellen. Eine solche Interaktion von CagA und ASPP2 unterstreicht die anti-apoptotische Wirkungsweise von CagA während einer *H. pylori*-Infektion (Buti *et al.*, 2011).

#### 2.1.4.4 CagA vermittelte Zellmotilität in *H. pylori* infizierten Epithelzellen

Der *H. pylori*-induzierte *Hummingbird* Phänotyp basiert einerseits auf einer gesteigerten Zellmotilität, dem *Scatter*, andererseits auf der Elongation der infizierten Epithelzellen (Moese *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass diese *H. pylori*-induzierte Elongation auf dem sogenannten *retraction defect* basiert, hervorgerufen durch tyrosin-phosphoryliertes CagA (CagA<sup>YP</sup>) und der damit einhergehenden Interaktion mit zellulären Wirtsproteinen (Kwok *et al.*, 2007; Bourzac *et al.*, 2007).

Die Bindung des am Pilus des T4SS lokalisierten CagL mit  $\alpha_5\beta_1$  Intergrinen *H. pylori*-infizierter Zellen induziert die Aktivierung der Fokaladhäsionskinase (FAK) (Abb. 2.5). Dies geht mit einer Aktivierung von Src und der daraus resultierenden Tyrosinphosphorylierung an Tyrosin<sup>899</sup>, Tyrosin<sup>918</sup> und Tyrosin<sup>972</sup> der EPIYA-Motive von CagA im Wirtszellzytoplasma einher (Kwok *et al.*, 2007; Parsons *et al.*, 2000; Tammer *et al.*, 2007). Als Folge dessen interagiert CagA<sup>YP</sup> mit Shp2 und Csk (*carboxy terminal Src kinase*) und resultiert in eine Art negativen Rückkopplungsschleife für die Aktivität von FAK und Src. Eine Shp2-CagA<sup>YP</sup> Interaktion bewirkt eine Deaktivierung von FAK und führt zudem zu einer Aktivierung der Rap1 (*Ras-related protein*) → BRaf (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) → Erk Signalkaskade und der damit einhergehenden Elongation der infizierten Zellen (Tsutsumi *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2005). Im Falle von Src basiert dessen Inaktivierung auf einer Interaktion von CagA<sup>YP</sup> mit dem negativ Regulator von Src, Csk (*carboxy terminal Src kinase*) und bewirkt die Dephosphorylierung der Aktin Bindungsproteine Cortaktin, Ezrin und Vinculin (Tsutsumi *et al.*, 2003; Selbach *et al.* 2003; Selbach *et al.* 2004; Moese *et al.* 2007). Nach Inaktivierung von Src erfolgt eine Tyrosin-Phosphorylierung von zellulärem CagA bei fortwährender *H. pylori*-Infektion durch die Tyrosinkinase c-Abl (Poppe *et al.*, 2007; Tammer

et al., 2007). Im Gegensatz zu Src überträgt c-Abl neben Tyrosin<sup>899</sup> und Tyrosin<sup>918</sup> auch eine Phosphatgruppe an Tyrosin<sup>972</sup> an CagA (Tammer et al., 2007).



**Abbildung 2.5: Mechanismus der *H. pylori*-induzierten Elongation infizierter Epithelzellen.**

FAK und Src werden über die Integrin-CagL Interaktion aktiviert und tyrosinphosphoryliert (symbolisiert durch gelben Kreis mit PY). CagA wird über den Pilus in die Zelle injiziert und anfänglich durch Src tyrosinphosphoryliert (CagA<sup>YP</sup>). CagA<sup>YP</sup> interagiert mit Shp2 und Csk, was zu einer Inaktivierung von FAK und Src zu späteren Zeitpunkten (symbolisiert durch kleine Uhr) der *H. pylori* Infektion führt. Die Inaktivierung von Src bewirkt die Dephosphorylierung von Ezrin, Vinculin und Cortactin, während aktiviertes c-Abl für eine Aufrechterhaltung von CagA<sup>YP</sup> sorgt. Diese Prozesse tragen zu einer Deregulierung von fokalen Adhäsionskomplexen (FA) bei und bewirken eine Elongation der *H. pylori* infizierten Zellen. Zudem kontrollieren FAK, Src und c-Abl das Aktinzytoskelett über den nachgeschalteten CrkII/DOCK180/Rac1/WAVE/Arp2/3 Signalweg, der Einfluss auf Zellmigration nimmt (Schneider S. et al., 2008).

Abgesehen von der Phosphorylierung an CagA bewirkt die *H. pylori*-induzierte Aktivierung von c-Abl die Phosphorylierung des Adapterproteins CrkII, was zu weiteren zellmorphologischen Veränderungen der infizierten Zellen führt (Suzuki et al., 2005) (siehe Kapitel 2.2.5). Aufgrund ihrer Interaktion mit Adapterproteinen des Aktinzytoskeletts stellen FAK, Src und c-Abl zentrale Schaltermoleküle in der *H. pylori*-induzierten Zellelongation und -motilität und somit der Pathogenese von *H. pylori* dar. Erst kürzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass die Tyrosinphosphorylierung an CagA durch c-Src und c-Abl ein hierarchischer Prozess ist, in dem c-Src CagA an EPIYA-C/D zu einem frühen Zeitpunkt und c-Abl CagA an EPIYA-A, -B, -C und -D zu einem späteren Zeitpunkt einer *H. pylori*-Infektion phosphoryliert (Mueller, D. et al., 2012). CagA wird hierbei an einem oder zwei aber niemals an drei EPIYA-Motiven gleichzeitig innerhalb eines CagA-Proteins tyrosinphosphoryliert. EPIYA-C und -D stellen hierbei initiale Phosphorylierungsstellen dar, denen eine Phosphorylierung von EPIYA-A oder -B folgen kann. Eine auf CagA<sup>YP</sup>-basierende Zellelongation bedarf jedoch immer der Phosphorylierung von mindestens 2 EPIYA-Motiven. Die häufigste Kombination von phosphorylierten EPIYA-Motiven bei westlichen *H. pylori*-Stämmen wurde mit EPIYA-A

und –C nachgewiesen. Die Elongation der infizierten Zellen kann jedoch auch durch Dimerisierung zweier einzelner CagA-Proteine mit Phosphorylierung an jeweils unterschiedlichen EPIYA-Motiven erfolgen (Mueller, D. *et al.*, 2012). CagA besitzt eine sogenannte CagA-Multimerisierungssequenz (CM), über die eine solche Dimerisierung zweier CagA-Proteine erfolgen kann (Nagase *et al.*, 2011).

#### 2.1.4.5 *H. pylori*-vermittelte Apoptose infizierten Epithelzellen

Die Aufrechterhaltung eines strukturierten Gewebeverbands basiert auf der Homöostase des Epithels und beinhaltet eine Balance zwischen Proliferation und Apoptose der epithelialen Zellen (Hall *et al.*, 1994). Im Zuge einer *H. pylori*-Infektion kann es zu einer Verschiebung des äquivalenten Verhältnisses zwischen apoptotischen und proliferierenden Zellen der gastralen Mukosa kommen. In unterschiedlichen Stadien einer *H. pylori*-Infektion kann dies zu einer Manifestierung einer erhöhten Zellproliferation und einer gesteigerten oder verminderten Induktion von Apoptose in den infizierten Zellen führen. Ein solches Ungleichgewicht, hervorgerufen durch *H. pylori*, trägt maßgeblich zu der Entstehung von gastralen Krankheiten wie chronischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, MALT-Lymphome oder Magenkrebs bei (Blaser und Atherton, 2004; Xia *et al.*, 2001). Sowohl in *in vivo* als auch *in vitro*-Studien wurde die apoptotische Wirkungsweise von *H. pylori* bestätigt. Während in *in vivo* Studien Faktoren wie die Zugehörigkeit zu ethnischen Gruppen, Lebensumstände oder Art des *H. pylori*-Stamms Ausschlag gebend sind, beeinflussen in *in vitro*-Studien die Wahl von Zelllinien und *H. pylori*-Stämmen, Zellkulturbedingungen, die applizierte Menge an Bakterien, die gewählte Infektionszeit und das Vorhandensein bestimmter *H. pylori*-Virulenzfaktoren die Induktion von pro- und anti-apoptotischen Prozessen in den Zellen maßgeblich (Ashktorab *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000; Le'Negrate G *et al.*, 2000). Die Anwesenheit der *H. pylori*-Virulenzfaktoren *cagPAI*, *VacA* und LPS treibt nachweislich die Induktion von Apoptose in infizierten Epithelzellen und T-Lymphozyten voran (Moss *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2001; Cover *et al.*, 2003; Kawahara *et al.*, 2001). Die zellulären Mechanismen, die mit einer *H. pylori*-induzierten Apoptose einhergehen, beinhalten unter anderem die Aktivierung von Todesrezeptoren wie der *fibroblast-associated-Rezeptor* (FasR, auch *cluster of differentiation 95* (CD95) oder *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6* (TNFRSF6) genannt) oder Zytokin-Rezeptoren wie dem Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ -Rezeptor (TNF $\alpha$ -Rezeptor) und resultieren in einer Aktivierung der Initiator-Caspase 8 und der nachgeschalteten Caspase-Kaskade (Yan *et al.*, 2009; Rudi *et al.*, 1998). Neben der Aktivierung dieses extrinsischen Apoptosewegs wurde auch eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs im Zuge einer *H. pylori*-Infektion dokumentiert. Ein Grund hierfür ist unter anderem das vermehrte Aufkommen an reaktiven Sauerstoff-Spezies (*Reactive*

Oxygen Species ROS), hervorgerufen durch die Aktivierung und Rekrutierung ROS-produzierender, phagozytotischer Leukozyten zur gastralen Mukosa in *H. pylori*-infizierten Patienten (Clement, M. V. und Pervaiz 1999; Davies *et al.*, 1994; Drake *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1997). Andere Studien haben gezeigt, dass *H. pylori* selbst ROS generiert (Nagata *et al.*, 1998). Eine Infektion mit *H. pylori* kann zudem eine Entstehung von ROS durch die Steigerung an proinflammatorischen Zytokinen in den infizierten Zellen bewirken oder den Gehalt an Ascorbinsäure mindern, welche ein wichtiges Antioxidans in Säugetieren darstellt und ROS bindet (Ding *et al.*, 2007, Ruiz *et al.*, 1994, Sobalo *et al.*, 1993). Desweiteren bedingt eine Infektion mit *H. pylori* eine erhöhte Expression und gesteigerte Aktivität der Spermin-Oxidase (SMO) und als Resultat dessen die Generierung von  $H_2O_2$  in den infizierten Zellen (Xu *et al.*, 2004). Eine Aktivierung dieses intrinsischen Apoptosewegs durch *H. pylori* führt zu einem Entlassen von Zytochrom C aus den Mitochondrien, der Aktivierung der Caspase 3 und somit der nachfolgenden Apoptose-Kaskade in den infizierten Zellen (Xu *et al.* 2004, Chaturvedi *et al.*, 2004).

Neben den oben beschriebenen Prozessen kann eine Infektion gastraler Zellen mit *H. pylori* zudem eine Stabilisierung und Aktivierung von dem Tumorsuppressor Protein53 (p53) hervorrufen (Ashktorab *et al.*, 2003). P53 fördert die Transkription von Genen, deren Produkte wiederum die zelluläre Apoptosemaschinerie aktiv vorantreiben (Vogelstein *et al.*, 2000). Die Dynamik zwischen der Induktion apoptotischer und anti-apoptotischen Prozesse im Zuge einer *H. pylori*-Infektion wurde erst kürzlich wieder anhand einer Interaktion von CagA mit dem Apoptose-stimulierenden Protein2 von p53 (ASPP2) verdeutlicht. Zum einen führt eine Infektion mit *H. pylori* zu einer gesteigerten p53 Aktivität, zum anderen führt die Interaktion von CagA mit ASPP2 zu einer Bindung von ASPP2 und p53 (Buti *et al.*, 2011). Die Bindung von ASPP2 und p53 führt zu dem Abbau von p53 durch das Proteasomensystem in den *H. pylori*-infizierten Zellen und unterstreicht die anti-apoptotische Wirkungsweise von CagA während einer *H. pylori*-Infektion (Buti *et al.*, 2011).

## 2.2 Die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase c-Abl

„Die Tyrosinkinase c-Abl (Abl1) bildet zusammen mit seinem Paralog Arg (Abl2) die Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Hanks, 2003). C-Abl kommt eine Reihe von zellulären Funktionen zu, so dass man es als eine Art zelluläres Schalterprotein bezeichnen kann. In Abhängigkeit von seiner Lokalisierung in der Zelle und Interaktionspartnern hat es Einfluss auf zelluläre Prozesse wie die Regulierung von Zellproliferation und Apoptose, Kontrolle des Aktin-Zytoskeletts, Zellmorphologie und -migration (Pendergast, 2002)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007).

### 2.2.1 Rolle von c-Abl als Protoonkogen

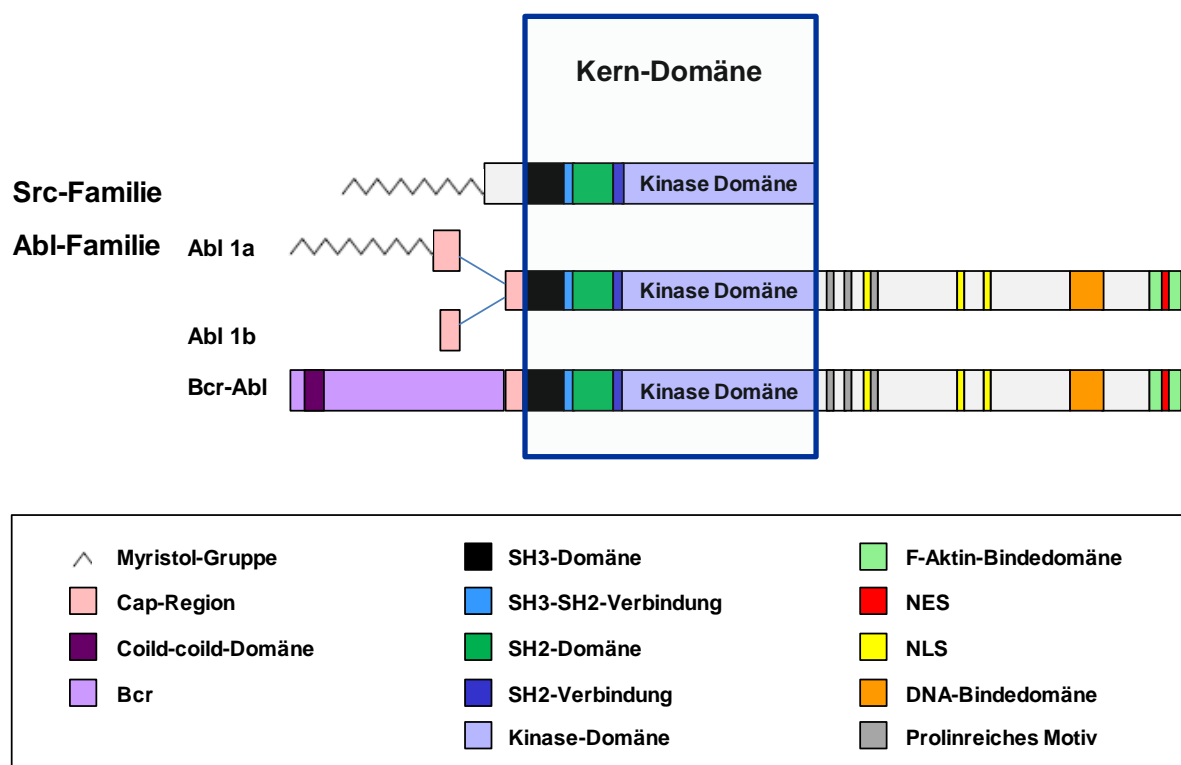
„1970 wurde erstmals von H. T. Abelson Maus-Abl isoliert. Es handelte sich hierbei um das retrovirale Onkoprotein des *Abelson murine leukaemia virus* v-Abl (Abelson *et al.*, 1970). C-Abl kommt eine wichtige Funktion als humanes Protoonkogen zu. Durch eine Translokation der auf Chromosom 9 lokalisierten *abl1*-Gensequenzen auf die *BCR*-Region (*break point cluster region*) von Chromosom 22 entsteht das sogenannte „Philadelphia-Chromosom“ (Rowley, 1973; Groffen *et al.*, 1984). Eine Expression des *BCR-ABL* auf dem Philadelphia-Chromosom resultiert in einem 210kDa oder 185kDa großen Bcr-Abl-Fusionsproteins (Rowley, 1973; Groffen *et al.*, 1984; Heisterkamp *et al.* 1985; Nowell und Hungerford 1960). Das Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms und des daraus resultierenden Bcr-Abl-Fusionsproteins wird in direkten Zusammenhang mit verschiedenen Formen der Leukämie gebracht (Ben Neriah *et al.*, 1986b; Melo 1996; Saglio *et al.*, 1997). Patienten mit chronischer Knochenmarksleukämie (*chronic myelogenous leukemia* - CML) weisen vor allem das 210 kDa große Bcr-Abl auf, wohingegen in Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (*acute lymphotic leukemia* - ALL) das 185 kDa große Fusionsprotein nachgewiesen wurde (Konopka *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1987; Kurzrock *et al.*, 1987). Die onkogene Wirkung des Bcr-Abl-Fusionsproteins basiert auf der konstitutiven Aktivität der Abl Kinase und führt zu einem Verlust von regulierenden Zellproliferations- und Differenzierungssignalen sowie bestimmter Adhäsionsmoleküle in den jeweiligen Zellen (Raitano *et al.*, 1997; Daley *et al.*, 1990). Dies bewirkt eine unregelmäßige Vermehrung der Bcr-Abl positiven Zellen. Die Expansion dieser Zellen im Knochenmark und deren Ausschwemmung im Blut sind charakteristisch für CML und ALL (Shepherd, 1994; Advani und Pendergast, 2002; Goldman und Melo, 2003). Ein wichtiges Therapeutikum gegen CML ist der Abl-spezifische Kinase-Inhibitor STI-571 (*signal transduction inhibitor-571*) auch Imatinib oder Glivec® genannt, der das Wachstum von Bcr-Abl positiven Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibiert (Buchdunger *et al.*, 1996; Druker *et al.*, 1996; Deininger *et al.*, 2000). Neben der onkogenen Wirkung von c-Abl als konstitutiv aktives Bcr-Abl Fusionsprotein in CML und ALL wurde zudem eine erhöhte Abl- und Arg-Aktivität in Brust- oder Darmkarzinomen beobachtet (Srinivasan und Plattner, 2006). Dies unterstreicht erneut die Notwendigkeit, die Entgleisung dieser Tyrosinkinase in Bezug auf weitere Krebs-assoziierte Krankheiten hin zu untersuchen“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007).

### 2.2.2 Struktur und Regulierung von c-Abl

C-Abl ist eine 145 kDa große, konservierte Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase und beinhaltet neben seiner Kinase-Domäne eine N-terminale Cap-Region (*adenylat cyclase-associated protein*), zwei Src-Homologie (SH)-Domänen, eine DNA-Bindedomäne, drei nukleare Lokalisierungssignale (NLS), eine Aktin-Bindedomäne und ein nukleares Exportsignal (NES)

(Abb. 2.6) (Taagepera *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 1996; McWhirter und Wang, 1993; van Etten *et al.*, 1994; Kipreos und Wang, 1992).

„Durch alternatives Splicing der *c-Abl* RNA an Exon 5` entstehen die zwei Isoformen c-Abl 1a und Abl 1b (Heisterkamp *et al.*, 1982; Wetzler *et al.*, 1993). Das c-Abl 1b-Protein besitzt im Gegensatz zu Abl 1a einen Myristolrest am N-Terminus des Proteins, der unterstützend in dessen Autoinhibierung wirkt und zudem eine zusätzliche Interaktion mit der Zellmembran ermöglicht (Nagar *et al.*, 2003)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Im Anschluss daran befindet sich eine sogenannte Cap-Region, die die Autoinhibierung der Kinaseaktivität von c-Abl unterstützt (Pluk *et al.*, 2002). An die Cap-Region schließt sich die Kernregion von c-Abl an. Diese beinhaltet eine SH3-, SH2- (*src homology* – *SH*) und eine Kinasedomäne. Im Bereich dieser Kerndomäne weist c-Abl eine große Ähnlichkeit zu den Kinasen der Src-Familie auf (Hantschel und Superti-Furga, 2004). Die SH3- und SH2-Domäne von c-Abl stellen eine zentrale Bindestelle für Interaktionspartner dar, wobei SH3 an prolinreiche Bereiche und SH2 vorwiegend an tyrosinphosphorylierte Domänen von Interaktionspartnern bindet (Superti-Furga und Courtneidge, 1995).



**Abbildung 2.6: Strukturdomänen der Src- und Abl Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (nach Hantschel und Superti-Furga, 2004).** Die Abbildung zeigt die Domänen der Sequenzähnlichkeiten und –unterschiede der Src- und Abl-Kinase-Familien. Nicht dargestellt ist bei Src der phosphorylierte C-Terminus. Der blaue Kasten kennzeichnet die Src und Abl gemeinsame Kerndomäne, die die SH3-, SH2- und Kinase-Domänen beinhaltet. Die Spleißvarianten von Abl 1a und 1b unterscheiden sich durch das Vorhandensein der myristylierten Aminosäure in der 1a Variante. Genauere Funktionen sind der Strukturen sind in Abschnitt 2.2.2 aufgeführt.

Bindungspartner der SH3-Domäne sind unter anderem WAVE-2 (*WASP family verprolin-homologous protein*) (Stuart *et al.*, 2006), Cbl (*casitas B-cell lymphoma*) (Miyoshi-Akiyama *et al.*, 2002), ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), (Shafman, T. *et al.*, 1997), Abi (*Abelson interacting protein*) (Cao *et al.*, 2008) oder p73 (Tumor-Suppressorgen p53-Homolog) (Yuan *et al.*, 1999). Zu Interaktionspartnern der SH2-Domäne zählen zum Beispiel EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Zhu *et al.*, 1993), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) (Srinivasan *et al.*, 2009), c-Jun (Barila *et al.*, 2000) oder Abi. Verbunden sind die beiden Regionen über eine kurze SH3-SH2-Verbindungsregion. Den zwei SH-Domänen kommt zudem eine zweite wichtige Funktion in der Autoinhibierung von c-Abl zu, über die die Aktivität der Kinase genau reguliert wird. Über eine SH2-Verbindungsregion schließt die SH2-Domäne an die Kinase-Domäne, die die enzymatische Komponente von c-Abl beinhaltet. Sie bindet an tyrosinhaltige Substrate und bewirkt deren Phosphorylierung. Interaktionspartner hierfür sind unter anderem Rb (Retinoblastoma-Protein) (Welch *et al.*, 1993) oder WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) (Schulte *et al.*, 2003). „Durch eine Bindung der Cap-Region an einer prolinreichen Region (Pro<sup>242</sup>) am C-terminalen Ende der Kinase-Domäne bilden die SH2- und SH3-Domäne eine Art Klemme. Diese Konformation bewirkt eine Inhibierung der autokatalytischen Aktivität der Tyrosinkinase (Pluk *et al.*, 2002; Nagar *et al.*, 2003)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Eine Mutation dieser Aminosäure führt zu einer konstitutiv aktiven Form von c-Abl (Barila und Superti-Furga 1998). Neben der N-terminalen Kerndomäne besitzt c-Abl einen langen C-terminalen Bereich, der prolinreiche Bereiche beinhaltet, die einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen. Diese basieren oft auf der Bindung an SH3-Domänen der Interaktionspartner wie zum Beispiel Crk (*v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog* (Vogel)), Grb2 (*growth factor receptor-bound protein*), und Nck (*NCK adaptor protein*) (Feller *et al.* 1994a; Smith *et al.*, 1999). Weitere Bestandteile des C-Terminus von c-Abl sind eine DNA-Bindestelle, Bindestellen für p53 (Goga *et al.*, 1995), die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II (Baskaran *et al.*, 1996) oder für globuläres (G-) und filamentöses (F-) Aktin (Van Etten *et al.*, 1994). Desweiteren beinhaltet der C-terminale Bereich drei NLS (nukleare Lokalisierungssignale) und ein NES (nukleares Exportsignal), die eine Translokation zwischen Zytoplasma und Zellkern ermöglichen (Van Etten *et al.*, 1989; Taagepera *et al.*, 1998). Zusätzlich zu der Autoinhibierung von c-Abl besteht mit dem Einsatz der pharmakologischen Inhibitoren STI-571 (Gleevec<sup>®</sup> oder Imatinib) oder PD166326 eine weitere Möglichkeit, die Kinaseaktivität von c-Abl zu inhibieren. Beide binden an der ATP-Bindungsstelle am N-terminalen Lobus der Kinase-Domäne und führen somit zu einer Inaktivierung der Tyrosinkinase (Nagar *et al.*, 2002). Neben STI-571 und PD166326 bewirken einige Bindungspartner von c-Abl eine Herunterregulierung seiner Kinaseaktivität. Zu ihnen zählen zum Beispiel das Rb-Tumorsuppressorprotein, F-Aktin und die Ubiquitin-Ligase Cbl. Während das nukleare Rb



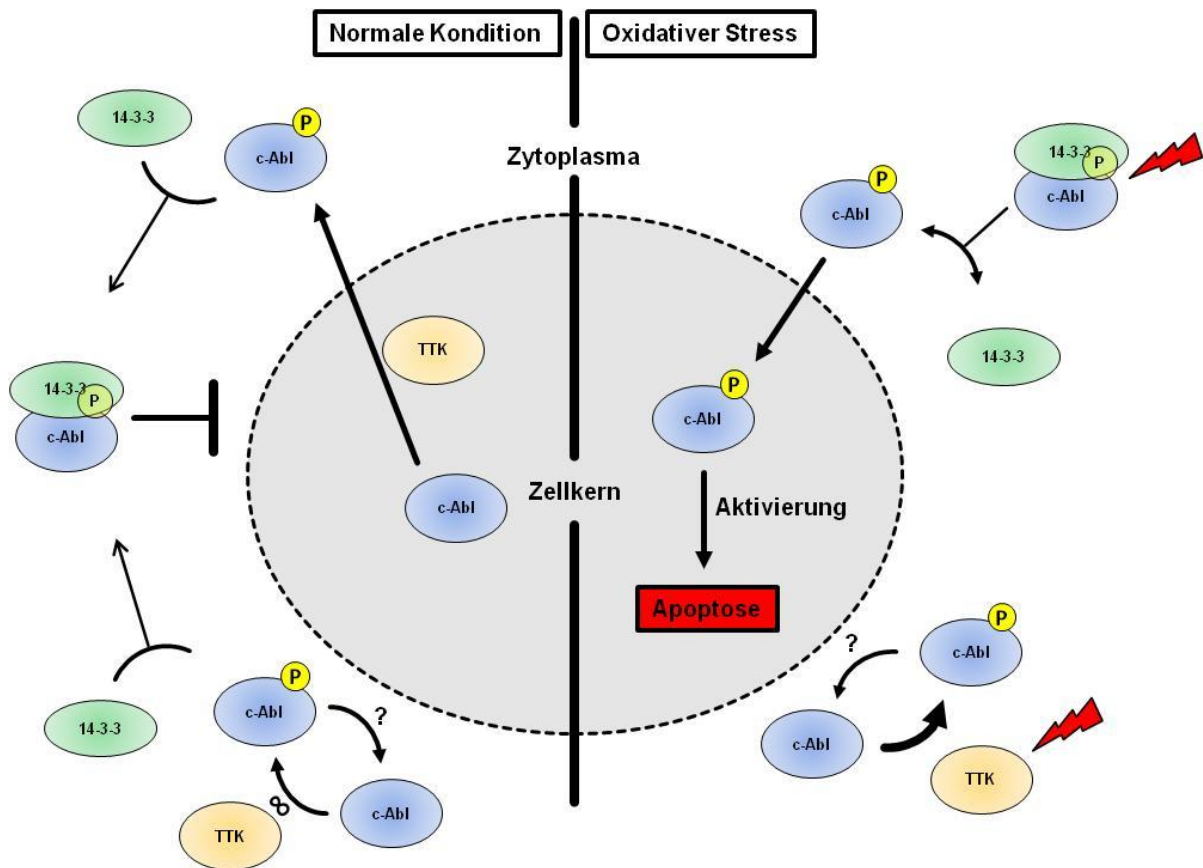
über eine Bindung an den N-terminalen Lobus der Kinase-Domäne c-Abl in seiner Aktivität inhibiert, bewirkt eine Bindung von F-Aktin an der Aktin-Bindedomäne eine Reduktion der Kinaseaktivität im Zytoplasma (Welch *et al.*, 1993; Woodring *et al.*, 2001). Cbl indessen fungiert als eine negative Rückkopplungsschleife. Aktiviertes c-Abl tyrosinphosphoryliert Cbl, was zu dessen Aktivierung und somit dem Abbau von c-Abl über den Proteasomenweg führt (Soubeyran *et al.*, 2003). Desweiteren führt eine Dephosphorylierung von c-Abl an Y<sup>245</sup> und Y<sup>412</sup> durch die Bindung von Tyrosinphosphatasen des PEST (Prolin-Glutatmat-Serin-Threonin) Types zu einer Minderung der Kinaseaktivität (Cong *et al.*, 2000).

„Eine Aktivierung der Kinaseaktivität erfolgt nach einer Bindung von Phosphopeptiden in der Aktivierungsschleife von c-Abl, die in einer Phosphorylierung an Tyrosin<sup>412</sup> (Y<sup>412</sup>) der Kinase-Domäne resultiert (Nagar *et al.*, 2003). Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung von Src in Fibroblasten durch PDGF, die zu einer Phosphorylierung von c-Abl an Y<sup>412</sup> beiträgt (Plattner *et al.*, 1999). Diese initiale Y<sup>412</sup> Phosphorylierung trägt wiederum zu einer gesteigerten Autophosphorylierung von c-Abl<sup>Y412</sup> bei. Für eine vollständige Aktivierung der Kinaseaktivität bedarf es zudem einer Phosphorylierung von Tyrosin<sup>245</sup> (Y<sup>245</sup>) in der SH2-Verbindungsregion zwischen SH2- und Kinase-Domäne (Brasher und van Etten, 2000)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Dies hat eine strukturelle Änderung des Moleküls zur Folge, die die Bindung von P<sup>242</sup> an der SH3-Domäne löst (Barila und Superti-Furga 1998; Brasher und Van Etten 2000).

### 2.2.3 Nukleares c-Abl und seine Funktion in der Zelle

„Die Funktion von c-Abl wird bestimmt durch die Interaktion mit zahlreichen Bindungspartnern, dem Einfluss unterschiedlicher Stimuli wie oxidativem Stress und DNA-Schädigung sowie seiner Lokalisierung in der Zelle. Neben Zytoplasma und Zellkern wurde c-Abl auch im endoplasmatischen Retikulum (ER), im Mitochondrium und dem Zellkortex von Mammaliazellen gefunden (Ito *et al.*, 2001; van Etten *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 1996; Koleske *et al.*, 1998). Eine Translokation von c-Abl zwischen Zellkern oder Zytoplasma wird durch drei distinkte nukleare Lokalisierungssignale (NLS) in den Kern und ein nukleares Exportsignal (NES) aus dem Kern am C-Terminus von c-Abl bestimmt (Pendergast, 2002; Taagepera *et al.*, 1998). Ist eine dieser Signalsequenzen mutiert oder überdeckt durch die Interaktion mit einem Bindungspartner, so bleibt eine Translokation von c-Abl zwischen Zellkern und Zytoplasma aus. Zudem bewirkt eine Acetylierung an Lysin<sup>730</sup> (K<sup>730</sup>) des zweiten NLS durch Histon-Acetyltransferasen eine Unterbindung der Translokation von c-Abl zwischen den zwei Zellkompartimenten (Taagepera *et al.*, 1998; di Bari *et al.*, 2006). Ein Beispiel für einen zytoplasmatischen Bindungspartner ist das Protein 14-3-3. Dieses 25-30 kDa großes Protein bindet über 200 Zielmoleküle und ist an der Kontrolle von Zellzyklus, Wachstum, Differenzierung, Zellüberleben, Apoptose und Migration in Zellen beteiligt

(Mhawech, 2005, Review)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). 14-3-3 bindet an Serin- oder Threonin-phosphorylierte Proteine mit der charakteristischen Aminosäure-Konsensussequenz RSXpS/TXP ((R) Arginin, (S) Serin, (X) variable Aminosäure, (p) phosphoryliert, (T) Threonin, (P) Prolin) und bewirkt so deren Verankerung im Zytoplasma (Muslin *et al.*, 1996). Eine Phosphorylierung von c-Abl an Threonin<sup>735</sup> (p-c-Abl<sup>T735</sup>) durch die Tyrosin und Serin-/Threonin-dualspezifische Kinase TTK ermöglicht eine Bindung von 14-3-3 an p-c-Abl<sup>T735</sup> (Lauze *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 2005; Nihira *et al.*, 2008). Hierbei bindet 14-3-3 flankierend das phosphorylierte T<sup>735</sup> an dem zweiten und dritten NLS von c-Abl und unterbindet auf diese Weise die Translokation von c-Abl in den Zellkern (Abb. 2.7) (Yoshida *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch TTK ist von transientser Natur, jedoch verursacht genotoxischer Stress eine Erhöhung der c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung in den Zellen (Nihira *et al.*, 2008).



**Abb. 2.7: Schematische Darstellung von c-Abl und dessen Interaktion mit dem zytoplasmatischen Protein 14-3-3 (nach Yoshida *et al.*, 2005 und Nihira *et al.*, 2008).** Hypothetisches Model der intrazellulären Lokalisierung von c-Abl (blau) reguliert durch TTK (orange). Unter normalen Konditionen (links) transloziert c-Abl zwischen Zellkern und Zytoplasma. Nach konstitutiver ( $\infty$ ) Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (gelbes P) durch TTK ermöglicht dies die Bindung an dem zytoplasmatischen 14-3-3 (grün) und der Verankerung von c-Abl im Zytoplasma. Unter dem Einfluss von genotoxischem Stress (roter Blitz), zum Beispiel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bewirkt dies eine erhöhte TTK Aktivität und zugleich die Trennung von 14-3-3 und c-Abl. Ungebundenes c-Abl transloziert in den Zellkern und führt nach dessen Aktivierung zur Induktion von Apoptose.

Die Einwirkung von DNA-schädigenden Agenzien wie zum Beispiel Adriamycin (ADR) hingegen bewirkt eine Auflösung dieses 14-3-3-c-Abl-Komplexes. Dies beruht auf der Aktivierung der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und der daraus resultierenden Phosphorylierung von 14-3-3. Das phosphorylierte 14-3-3 entlässt c-Abl aus der Bindung in das Zytoplasma. Die überdeckten NLS sind somit wieder zugänglich und c-Abl kann in den Zellkern translozieren (Yoshida *et al.*, 2005). Eine Phosphorylierung an T<sup>735</sup> beeinflusst die Kinaseaktivität von c-Abl nicht (Yoshida *et al.*, 2005). Bleibt jedoch eine Phosphorylierung an T<sup>735</sup> durch eine Mutation von Threonin zu Alanin aus oder wird die Expression von TTK unterbunden, erfolgt keine Bindung von c-Abl an 14-3-3 und c-Abl kann direkt in den Zellkern translozieren (Yoshida *et al.*, 2005; Nihira *et al.*, 2008).

„Die Bindung von c-Abl an 14-3-3 kann zudem von dem Onkogen MUC1 (*mucin 1, cell surface associated*) beeinflusst werden (Raina *et al.*, 2006). MUC1 ist ein transmembranes Glykoprotein und an der apikalen Seite sekretorisch-epithelialer Zellen lokalisiert (Ligtenberg *et al.*, 1992; Kufe *et al.*, 1984). Es ist Teil des stressinduzierten Überlebensprogrammes der Zelle (Vermeer *et al.*, 2003). MUC1 begünstigt das Überleben der Zelle, indem es nach bestimmten Stressstimuli von der Zellmembran an die äußere Mitochondrienmembran transloziert und dort das Entlassen apoptotischer Faktoren blockiert (Ren *et al.*, 2004, 2006). In Karzinomzellen ist MUC1 durch Transformation und Verlust seiner Polarität stark überexprimiert und über die gesamte Zellmembran verteilt (Kufe *et al.*, 1984). Im Zuge dessen findet eine übermäßige Lokalisierung des Proteins an der äußeren Mitochondrienmembran statt und verstärkt somit diesen antiapoptotischen Effekt (Ren *et al.*, 2004, 2006). Diese Lokalisierung wird durch eine Phosphorylierung von MUC1 an Tyrosin<sup>46</sup> (Y<sup>46</sup>) durch Src verstärkt (Raina *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2004, 2006). MUC1 wird zudem durch aktiviertes c-Abl, zum Beispiel durch den Einfluss DNA-schädigender Agentien, an Tyrosin<sup>60</sup> (Y<sup>60</sup>) phosphoryliert. Das phosphorylierte Y<sup>60</sup> fungiert als c-Abl-Bindemotiv. Es bindet c-Abl an seiner SH2-Domäne und hält es so an der Zytoplasmamembran zurück (Raina *et al.*, 2006). Durch diese Assoziation bewirkt MUC1 zudem eine Verminderung der T<sup>735</sup> Phosphorylierung von c-Abl, was in einer verminderten Bindung der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase an 14-3-3 resultiert (Raina *et al.*, 2006)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007).

„Beide dieser Mechanismen können eine Verankerung von c-Abl im Zytoplasma bewirken. Kommt es jedoch zu einer Translokation von c-Abl in den Zellkern mit anschließender Aktivierung der Kinase durch die fortwährende Einwirkung DNA-schädigender Agenzien, so induziert c-Abl unter Wechselwirkung mit p53 oder seinem Homolog p73 die Arretierung von Zellwachstum oder Apoptose (Shaul *et al.*, 2000, Review; Kharbanda *et al.*, 1998). Die Aktivierung und Interaktion von c-Abl mit p53 in Abhängigkeit von DNA schädigenden Agenzien stellt ein zentrales Thema in vielen wissenschaftlichen Arbeiten dar. So wurde zum Beispiel von Sionov *et al.*, 2001 eine inhibierende Wirkung von c-Abl auf degradative

Prozesse des p53-Proteins durch die E3 Ubiquitin Protein Ligase Mdm2 (*murine double minute 2 oncogene*) beschrieben (Sionov *et al.*, 2001). Sowohl c-Abl als auch p53 werden durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert (Liu *et al.*, 1996). Das aktivierte c-Abl bewirkt eine Akkumulierung von p53 im Zellkern, indem es in den Mdm2-vermittelten nuklearen Export und in die daraus resultierende Degradierung von p53 im Proteasomensystem interveniert (Sionov *et al.*, 2001)“ (S. Schneider Diplomarbeit, 2007).

#### 2.2.4 Zytoplasmatisches c-Abl und seine Funktion in der Zelle

Zellmigration ermöglicht es Zellen sich rasch den äußeren Veränderungen ihrer Umwelt anzupassen. Die Initiierung solcher zellmigratorischen Prozesse kann durch Stimulierung von Rezeptoren wie PDGFR durch einen Liganden, Bindung von Integrinen an extrazelluläre Matrixbestandteile (ECM) oder durch Bindung von Pathogenen wie *H. pylori* induziert werden (Alberts, 2004; Kwok *et al.*, 2007). Charakteristisch für migrierende Zellen ist eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, die mit Strukturen wie Lamellipodien und Filopodien einhergeht. Zwar unterscheiden sich die einzelnen zellmigratorischen Prozesse voneinander, jedoch ist ihnen allen eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts gemeinsam. Betrachtet man die Vielzahl von c-Abl-Interaktionspartnern und -Substraten, so beinhaltet ein Großteil derer Effektoren und Regulatoren des Aktinzytoskeletts (Coicelli, 2010). Neben der Interaktion von c-Abl mit Modulatoren des Aktinzytoskeletts wurden Abl-Protein-Kinasen als eine der wenigen Kinasen identifiziert, die direkt über ihre Aktin-Bindedomänen mit dem Aktinzytoskelett interagieren (Bradley und Koleske, 2009). Es ist daher nicht verwunderlich, dass c-Abl eine umfangreiche Funktion in der Reorganisation des Zytoskeletts und daraus resultierenden Zellmigration zukommt. Bestimmt wird dessen Funktion durch den jeweiligen Stimulus oder Interaktionspartner im Zytoplasma der Zelle. Eine Aktivierung von zytoplasmatischem c-Abl resultiert in zellmorphologischen Veränderungen wie der Ausbildung von Lamellipodien, Filopodien oder das Wachstum neuronaler Zellfortsätze basierend auf Aktin-Polymerisation (Woodring *et al.*, 2003).

#### 2.2.5 Zytoplasmatisches c-Abl und seine Funktion während einer *H. pylori* Infektion gastral-epithelialer Zellen

Eine Infektion epithelialer Zellen mit *H. pylori* resultiert in der Ausbildung des für *H. pylori* charakteristischen Scatter-Phänotyps (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001). Dieser basiert auf einer erhöhten Zellmotilität und Elongation der infizierten Zellen, hervorgerufen durch die Tyrosinphosphorylierung von bakteriellem CagA (p-CagA<sup>Y</sup>) im Zytoplasma der Wirtszellen (Stein *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2002). Neben der Phosphorylierung von CagA<sup>Y</sup> durch Src an Tyrosin<sup>899</sup>, Tyrosin<sup>918</sup> und Tyrosin<sup>972</sup> zu frühen Zeitpunkten einer *H. pylori* Infektion, basiert die Aufrechterhaltung von p-CagA<sup>Y</sup> nach Inaktivierung von Src auf der Aktivität von c-

Abl. C-Abl phosphoryliert CagA an Tyrosin<sup>899</sup>, Tyrosin<sup>918</sup> und Tyrosin<sup>972</sup> (Tammer *et al.*, 2007). Hierbei bewirkt die Infektion mit *H. pylori* eine Anreicherung von c-Abl in den fokalen Adhäsionskomplexen (FA) und *Membran-Ruffles* der infizierten Zellen (Poppe *et al.*, 2007). Eine Translokation von c-Abl aus dem Zellkern in FAs mit anschließender Aktivierung konnte zudem unabhängig von *H. pylori* durch die Stimulierung von Integrinen gezeigt werden (Lewis *et al.*, 1996). Diese räumliche Annäherung von c-Abl und dem bakteriellen CagA in den FAs resultiert in der Aktivierung von c-Abl und der fortwährenden Phosphorylierung von CagA<sup>Y</sup> (Tammer *et al.*, 2007). Infektionsexperimente mit gastralen Epithelzellen und einem *cagA*-defizienten *H. pylori*-Stamm und anschließender Messung der c-Abl Aktivität mit einem entsprechenden Antikörper haben gezeigt, dass die Aktivität von c-Abl zu 55% auf dem Vorhandensein von CagA während einer *H. pylori*-Infektion basiert. 45% der c-Abl Aktivität sind CagA-unabhängig und werden mit anderen *H. pylori*-Faktoren wie dem bakteriellen Adhäsin CagL in Verbindung gebracht (Tammer *et al.*, 2007). Eine Infektion gastraler Epithelzellen mit einer *H. pylori cagL*-Deletionsmutante resultiert in einer deutlichen Minderung der c-Abl Aktivität (Tammer *et al.*, 2007). CagL ist ein Bestandteil des *H. pylori* T4SS und ermöglicht als Adhäsine eine Interaktion des T4SS von *H. pylori* mit den Integrinen epithelialer Zellen (Kwok *et al.*, 2007). Unter Verwendung von c-Abl spezifischen Inhibitoren und c-Abl *knockdown* Experimenten, konnte deutlich eine Abhängigkeit der Elongation *H. pylori*-infizierter Zellen von aktiviertem c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion gezeigt werden. Hierbei formen p-CagA<sup>Y</sup>, c-Abl und das durch c-Abl an Tyrosin<sup>221</sup> (Y<sup>221</sup>) phosphorylierte CrkII<sup>Y221</sup> einen Komplex, der in einer Elongation der *H. pylori*-infizierten Zellen resultiert (Kapitel 2.1.4.4 Abb. 2.5). Auch eine Expression von exogenem, konstitutiv aktivem c-Abl und CagA in epithelialen Zellen bewirkt eine deutliche Elongation der Zellen (Tammer *et al.*, 2007). Die durch p-CrkII aktivierten Signaltransduktionswege sind von maßgeblicher Bedeutung für den *H. pylori*-induzierten Phänotyp infizierter Zellen. Mögliche p-Crk nachgeschaltete Wege sind zum Beispiel Crk > Sos1 > HRas > Raf1, Crk > C3G > Rap1 > B-Raf oder Crk > Dock180 > ELMO > Rac (Suzuki *et al.*, 2005). CrkII stellt einen wichtigen Regulator für die Membrantranslokation von Rho und Rac vermittelter Zelladhäsion dar und vermittelt somit eine Rho-Rac abhängige Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Ein Beispiel hierfür ist der Wirtszelleintritt bei *Shigella*, bei dem durch Abl Aktivierung CrkII<sup>Y221</sup> phosphoryliert wird. Als Folge dessen interagiert p-CrkII<sup>Y221</sup> mit tyrosinphosphoryliertem Cortaktin, was unterstützend auf den invasiven Phänotyp von *Shigella* wirkt. Auch in *H. pylori*-infizierten Zellen konnte eine sporadische Invasion der Zellen beobachtet werden, jedoch erfolgt dort eine rasche Dephosphorylierung von Cortaktin durch die Inaktivierung von Src.

### 2.3 Zielsetzung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der Threoninkinase, die die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen bewirkt, indem spezifische Inhibitoren, siRNA und *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen zum Einsatz kamen. Desweiteren wurde der Einfluss von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren auf die Induktion der Phosphorylierung in den infizierten Epithelzellen eruiert.

Nach Identifizierung der zellulären Faktoren sollte die Funktion der Phosphorylierung bezüglich ihrer Auswirkung auf Apoptose, Zellviabilität und Zellmigrationsverhalten erfolgen. Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften in Zellviabilitäts- und Migrationsassays wurden zwei stabile Zelllinien etabliert, die ein c-Abl-Wildtyp (c-Abl<sup>wt</sup>) Protein oder die phosphorylierungsresistente c-Abl-Mutante (c-Abl<sup>T735A</sup>) exprimierten.

In einem nächsten Schritt sollte der Einfluss der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf die Lokalisierung von c-Abl in Zytoplasma oder Zellkern während einer *H. pylori* Infektion gastraler Zellen gezeigt werden.

Abschließend wurde die Frage nach einer Interaktion von c-Abl mit dem Bindeprotein 14-3-3 in Abhängigkeit von der c-Abl T<sup>735</sup>-Phosphorylierung während einer *H. pylori*-Infektion beantwortet.

### 3. Material

#### 3.1 Bakterien

**Tabelle 3.1 Verwendete Bakterienstämme**

<i>H. pylori</i> -Stämme		Herkunft
P12 wt	Klinisches <i>H. pylori</i> Isolat eines Patienten mit einem Zwölffingerdarmgeschwür	(Schmidt & Haas 1994)
P12 $\Delta cagA$	Das <i>cagA</i> Gen wurde durch Insertion einer Chloramphenicol Kasette mutiert.	(Odenbreit et al. 2000)
P12 $\Delta PAI$	In flankierenden Abschnitten der PAI wurde ein Kanamycin-Resistenzgen kloniert.	(Wessler et al. 2000)
P12 $\Delta vacA$	Das <i>vacA</i> Gen wurde durch Transposon-Insertion mutiert.	(Schmidt & Haas 1994)
P12 $\Delta cagL$	Mutiertes <i>cagL</i> -Gen durch Insertion einer Chloramphenicol-Kasette	(Kwok et al., 2007)
P12 $\Delta cagL/cagLwt$	Komplementierte P12 $\Delta cagL$ -Mutante mit dem <i>cagL</i> -Gen	(Kwok et al., 2007)

<i>E. coli</i> -Stämme		Herkunft
DH5 $\alpha$	F' <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>f</sup> $\Delta(lacZ)M15$ <i>zzf::Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )/ <i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA glnV44</i> $\Phi 80 \Delta(lacZ)M15$ <i>gyrA96</i> GmbH, Frankfurt <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs
BL21	<i>E. coli</i> B F– <i>ompT hsdS</i> (rB – mB–) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tetr <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

#### 3.2 Zellen

**Tabelle 3.2 Verwendete Zelllinien**

Zelllinie		Wachstum	Herkunft	Referenz Nr.
AGS pNTAP-c-Abl <sup>wt</sup>		adhärent	diese Arbeit	
AGS pNTAP-c-Abl <sup>T735A</sup>		adhärent	diese Arbeit	
AGS	human gastrale Adeno-carcinom-Zellen	adhärent	ECACC, UK	ECACC (89090402)
MKN-28	human gastrale Adeno-carcinom-Zellen	adhärent	*	JCRB (0253)
MCF-7	humane Adenocarcinom-Zellen aus der Brust	adhärent	#	ATCC (HTB-22)

\* Prof. Dr. med. U. Sahin, Johannes Gutenberg Universität, Mainz; # Prof. Dr. R. Tönjes, Paul-Ehrlich-Institut, Langen; ATCC: American Type Culture Collection ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)); ECACC: European Collection of Cell Cultures ([www.ecacc.org.uk](http://www.ecacc.org.uk)); JCBR: Japanese Collection of Research Bioresources ([www.cellbank.nibio.go.jp](http://www.cellbank.nibio.go.jp))

### 3.3 Plasmide

**Tabelle 3.3 Verwendete Plasmide**

Vektor-Plasmid	Protein	Resistenz	Herkunft
pEGFP-c-Abl <sup>wt</sup>	EGFP-c-Abl <sup>wt</sup>	Kanamycin	Prof. Dr. K. Yoshida, Medical Research Institute, Tokyo, Japan
pEGFP-c-Abl <sup>T735A</sup>	EGFP-c-Abl <sup>T735A</sup>	Kanamycin	diese Arbeit
pcDNA3.1-c-Abl <sup>wt</sup>	Flag-c-Abl <sup>wt</sup>	Ampicillin	Prof. Dr. K. Yoshida
pcDNA3.1-c-Abl <sup>T735A</sup>	Flag-c-Abl <sup>T735A</sup>	Ampicillin	Prof. Dr. K. Yoshida
pGEX-6P-1-c-Abl <sup>wt1955-2055</sup>	GST-c-Abl <sup>wt1955-2055</sup>	Ampicillin	Dr. M. Poppe, Paul-Ehrlich-Institut, Langen
pGEX-6P-1-c-Abl <sup>T735A1955-2055</sup>	GST-c-Abl <sup>T735A1955-2055</sup>	Ampicillin	Dr. M. Poppe, , Paul-Ehrlich-Institut, Langen
pSGT-c-Abl <sup>wt</sup>	c-Abl <sup>wt</sup>	Ampicillin	Prof. Dr. G. Superti-Furga, Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Wien, Austria
pSGT-c-Abl <sup>T735A</sup>	c-Abl <sup>T735A</sup>	Ampicillin	diese Arbeit
pNTAP-B	TAP-Tag	Kanamycin	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn
pNTAP-c-Abl <sup>wt</sup>	TAP-c-Abl <sup>wt</sup>	Kanamycin	diese Arbeit Lasitschka/Schneider
pNTAP-c-Abl <sup>T735A</sup>	TAP-c-Abl <sup>T735A</sup>	Kanamycin	diese Arbeit Lasitschka/Schneider
LAP-MPS1 <sup>KD</sup>	LAP-TTK	Ampicillin	Jelluma <i>et. al.</i> , 2008

### 3.4 siRNA

**Tabelle 3.4 Verwendete siRNA**

Name	Zielgen	Herkunft
Kontrol siRNA-A	unspezifische siRNA	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Heidelberg
PKC siRNA (h)	Mischung aus 5 PKC-spezifischen 20-25 Nukleotide langen siRNAs	(human) Santa Cruz Biotechnologie Inc., Heidelberg
TTK siRNA (h)	Mischung aus 3 TTK-spez. (human) 20-25 Nukleotide langen siRNAs	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Heidelberg



### 3.5 Primer

**Tabelle 3.5 Verwendete Primer**

Verwendung	Sequenz in 5'-3' Orientierung	Referenz
<b>Mutageneseprimer</b>		
<b>c-Abl<sup>wt</sup> → c-Abl<sup>T735A</sup></b>	Forward: 5'-TGGAGGTCAGTCGCGCTGCCTCGGGACTT-3' Reverse: 5'-AAGTCCCGAGGCAGCGCGACTGACCTCCA-3'	diese Arbeit
<b>GAPDH</b>	Forward Primer: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3' Reverse Primer: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<b>pNTAP-B</b>	Forward Primer (T3): 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' Reverse Primer (T7): 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn

Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Operon Biotech, Ebersberg bezogen; f: *forward*; r: *reverse*

### 3.6 Enzyme

#### 3.6.1 Kinasen

**Tabelle 3.6.1 Verwendete aktivierte Kinasen**

Name	Kinaseaktivität	Herkunft
Abl (human), active	Tyrosin-Kinase	Millipore GmbH, Schwalbach
PKC (human: αβγ), active	Serin-/Threonin-Kinase	Millipore GmbH, Schwalbach
PKC (human: δ), active	Serin-/Threonin-Kinase	Millipore GmbH, Schwalbach

#### 3.6.2 Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme, die nicht Bestandteil eines Kits waren, wurden von der Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot verwendet.

#### 3.6.3 Ligasen und Polymerasen

**Tabelle 3.6.3 Verwendete Ligasen und Polymerasen**

Name	Funktion	Herkunft
Phusion	Thermostabile DNA-Polymerase mit hoher Genauigkeit	Finzymes, Thermo Fisher Scientific, Finland
T4-DNA-Ligase	Katalysiert die Bildung von Phosphodiester-	Fermentas GmbH, St. Leon-

brücken zwischen 5' und 3'-Hydroxyl-Enden  
doppelsträngiger DNA

### 3.7 Antikörper

**Tabelle 3.7.1 Verwendete Primär-Antikörper**

Name	Quelle	Konz.	Verd.	Herkunft
14-3-3 (H8)	Maus	[0,2 µg/µl]	WB 1:200 IP 4 µg	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
c-Abl Ab3	Maus	[ 1 µg/µl]	WB 1:1000 IP 4 µg	Calbiochem, Merck Biosciences GmbH, Bad Soden/Ts
c-Abl (K12)	Maus	[0,2 µg/µl]	IP 4µg	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
c-Abl (24-11)	Maus	[0,2 µg/µl]	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
c-Abl Phospho-Threonin <sup>735</sup>	Kaninchen	[0,2 µg/µl]	WB 1:1000	Cell Signalling New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
c-Abl Phospho-Tyrosin <sup>245</sup>	Kaninchen	[0,2 µg/µl]	WB 1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CagA	Maus	[ 1 µg/µl]	IP 4 µg	Aalto, Irlan
CagA	Kaninchen	[0,5 µg/µl]	WB 1:500	IBT-Immunological & Biochemical Testsystems GmbH
FlagM2	Maus	[ 1 µg/µl]	WB 1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
GAPDH	Maus	[ 1 µg/µl]	WB 1:5000	Abcam Limited, Cambridge, UK
GST	Ziege	[10 µg/µl]	WB 1:5000	Rockland, BioMol GmbH, Hamburg
PARP	Kaninchen	[0,2 µg/µl]	WB 1:1000	Cell Signalling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
PKCpan	Maus	[0,2 µg/µl]	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
PKCα/β	Maus	[0,25 µg/µl]	WB 1:1000	BD Pharmingen, Heidelberg
Phospho-PKC (pan) (βII Ser <sup>660</sup> )	Kaninchen	[0,2 µg/µl]	WB 1:1000	Cell Signalling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Phospho-PKCα/βII	Kaninchen	[0,2 µg/µl]	WB 1:1000	Cell Signalling, New England

(Thr<sup>638/641</sup>)

Phosphotyrosin (PY <sup>99</sup> )	Maus	[1 µg/µl]	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Primärserum	Maus		IP 2 µl	Paul-Ehrlich- Institut, Langen
Primärserum	Kaninchen		IP 2 µl	Paul-Ehrlich- Institut, Langen
TTK	Kaninchen	[0,2 µg/µl]	WB 1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

WB: Westernblot; IP: Immunpräzipitation

**Tabelle 3.7.2 Verwendete Sekundär-Antikörper**

Name	Quelle	Konjugat	Konz.	Verd.	Herkunft
IRDye <sup>®</sup> 680	Esel	Kaninchen	[1 µg/µl]	WB 1:15000	LI-COR <sup>®</sup> Biosciences, Bad Homburg
IRDye <sup>®</sup> 800CW	Esel	Maus	[1 µg/µl]	WB 1:15000	LI-COR <sup>®</sup> Biosciences, Bad Homburg
IRDye <sup>®</sup> 800CW	Esel	Ziege	[1 µg/µl]	WB 1:15000	LI-COR <sup>®</sup> Biosciences, Bad Homburg

### 3.8 Stimulanzen

**Tabelle 3.8 Verwendete Stimulanzen**

Name	Konz.	Herkunft
Phorbol-12-Myristol-13-Acetat (PMA)	[ 1 mM]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sorbitol	[500 mM]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	[ 1 M]	Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	[ 500 µM]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### 3.9 Inhibitoren

**Tabelle 3.9 Verwendete Inhibitoren**

Name	Zielkinase	Konz.	Herkunft
Complete Protease	zelluläre Proteinasen	[25 fach]	Roche Diagnostics

Inhibitor Tablets (PIT)			GmbH, Mannheim
Gö6850	Protein Kinase C (PKC)	[ 1 mM]	Calbiochem®, Merck
(Bisindolylmaleimide I )			Bioscience, Bad
			Soden/Ts
Gö6983	Protein Kinase C (PKC)	[ 1 mM]	Calbiochem®, Merck
			Bioscience, Bad
			Soden/Ts
Rottlerin	Protein Kinase C <sup>δ</sup> (PKC <sup>δ</sup> )	[ 1 mM]	Calbiochem®, Merck
			Bioscience, Bad
			Soden/Ts
Staurosporin	Protein Kinase A, -C, -G, CaM Kinase	[ 1 mM]	Calbiochem®, Merck
			Bioscience, Bad
			Soden/Ts

### 3.10 Transfektionsreagenzien

Für die Transfektion von Plasmid-DNA wurde die Transfektionsreagenz GeneJuice® der Firma Novagen®, Merck Bioscience, Bad Soden/Ts verwendet.

### 3.11 Kits

**Tabelle 3.11 Verwendete Kits**

Name	Herkunft
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
MTT Assay	Milipore GmbH, Schwalbach
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey - Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin® RNAII Isolation Kit	Macherey - Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoBond® Xtra Maxi Plus Plasmid	Macherey - Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen™, Heidelberg
QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TOPO-TA Klonierungskit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 3.12 Chemikalien

**Tabelle 3.12 Verwendete Chemikalien**

Name	Herkunft
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Acrylamid 37, 5:1 Roti-Phorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dithiotreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Desoxycholat (DOC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNA-Marker	GeneRuler <sup>®</sup> , Fermentas
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Kaliumhydrophosphat	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
L-Glutamin	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Magnesiumchlorid	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem Merck Biosciences, Bad Soden/Ts
Natriumazit	0,01% in PBS, Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Natriumchlorid	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natrium-(ortho)-vanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	4% in PBS, Merck Biosciences, Bad Soden/Ts
Pefablock	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Proteinmarker	<i>prestained</i> PageRuler, Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA)	Fraktion V Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10%	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Sypro Ruby Gel Stain	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton-X 100	0,2% gelöst in PBS Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### 3.13 Lösungen, Medien, Puffer

**Tabelle 3.13 Verwendete Lösungen, Medien, Puffer**

Name	Herkunft
DNA Ladepuffer, 6-fach	50% Glycerin, 0,8% Bromphenolblau, 1 mM
TAE-Puffer, 20-fach	800 mM Tris-Azetat pH 8, 20 mM EDTA
Tris pH 6,8; 7,4; 8,0; 8,8	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut EDTA

**Tabelle 3.13.1 Bakterien**

Name	Zusammensetzung
Gehirn-Herz-Medium (BHI) ( <i>brain-heart-infusion</i> )	37 g Hirn-Herz-Pulver pro 1L H <sub>2</sub> O
Kryomedium	70% BHI-Medium, 20% Glycerin, 10% FKS
Vitamin-Lösung	2 ml Trimethoprim-Lösung [2,5 mg/ml], 100 g Dextrose, 10 g L-Glutamin, 26 g L-Cystein, 100 mg Cocarboxylase, 20 mg Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , 3 mg Thiamin-Cl, 13 mg p-Aminobenzolsäure, 250 mg Diphosphopyridin-nukleotid, 10 mg Vitamin B12, 1,1 g L-Cystin, 1,0 g Adenin, 30 mg Guanin-Cl, 150 mg Arginin, 0,5 g Uracil, mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und steril filtriert
<i>Helicobacter</i> -Platten	500 ml GC-Agar, 50 ml Pferdeserum, 50 µl Nystatin [10 m/ml], 500 µl Vancomycin [10mg/ml], 5 ml Vitamin-Lösung

Zur Kultur der *H.p.*-Mutanten wurden zusätzlich 6 µg/ml Chloramphenicol oder 8 mg/ml Kanamycin hinzugefügt.

**Tabelle 3.13.2 Zellkultur**

Name	Herkunft
DMEM-Medium, 1 µg Glucose	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
RPMI 1640-Medium, 4 µg Glucose	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Trypsin/EDTA	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Trypsin Melnick (ohne EDTA)	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
PBS-Dulbecco	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut

**Tabelle 3.13.3 Zellysate**

Name	Zusammensetzung
Lysispuffer	20 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM Natriumchlorid, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,1% SDS Inhibitoren frisch dazu: 1x PIT, 1 mM Natriummolybdat, 1 mM Natrium-(ortho)-vanadat, 20 mM Natriumfluorid, 10 mM, Natriumpyrophosphat, 20 mM $\beta$ -Glycerol phosphat

**Tabelle 3.13.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Name	Zusammensetzung
4 x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris pH 6,8, 20% Glycerol, 6% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 10% $\beta$ -Mercaptoethanol
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

**Tabelle 3.13.4.1 Zusammensetzung SDS-Trenngel in 10 ml**

Trenngel 10 ml	7%	10%	12%	15%
H <sub>2</sub> O	3,8 ml	2,8 ml	2,1 ml	1,1 ml
30% Acylamid	2,3 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
1M Tris/HCl pH 8,8	3,7 ml	3,7 ml	3,7 ml	3,7 ml
10% SDS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Auf 10 ml Trenngel 100  $\mu$ l APS und 10  $\mu$ l TEMED frisch hinzugeben.

**Tabelle 3.13.4.2 Zusammensetzung SDS-Sammelgel in 10 ml**

Sammelgel 3 ml	4%
H <sub>2</sub> O	2,2 ml
30% Acylamid	0,39 ml
1M Tris/HCl pH 6,8	0,38 ml
10% SDS	30 $\mu$ l

Auf 3 ml Sammelgel 30  $\mu$ l APS und 3  $\mu$ l TEMED frisch hinzugeben.

**Tabelle 3.13.5 Western Blot**

Name	Zusammensetzung
------	-----------------

Blocklösung	Roti®-Block 1:10 verdünnt mit H <sub>2</sub> O, 10 µM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol (frisch hinzugefügt)
TBS-T (Tris-Buffered-Saline-Tween)	Medienküche Paul-Ehrlich-Institut
Western Blot-Puffer	25 mM Tris pH8,3, 192 mM Glycin, 20% Methanol

**Tabelle 3.14 Verbrauchsmaterialien**

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
Campi-Gen™ Bakterien-Beutel	Oxoid GmbH
Drigalski Spatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Einfrierbox	Nunc A/S, Dänemark
Einmalhandschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH & Co KG
Einmal-Pipetten	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Einmal-Injektions-Kanüle, 0,40x20mm	Braun GmbH, Melsungen
Einmalspritzen 1ml	Braun GmbH, Melsungen
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Faltenfilter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glaspipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Impfeschlingen	Nunc A/S, Dänemark
Kryoröhrchen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Medibox	Braun GmbH, Melsungen
Millicell Cell Culture Inserts, 8µm Porengröße	Milipore GmbH, Schwalbach
Nitrocellulose Membran	Protran Whatmann
Plastikpipetten 3ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner BioChemica GmbH, Flacht
Plastikküvetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Petrischalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Thermometer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
UV-Küvetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Vivaspin 20 (Zentrifugalkonzentratoren)	Vivascience AG, Hannover
Wattestäbchen steril	VWR, Darmstadt
Zellschaber	Nunc A/S, Dänemark
Zellkulturflaschen T175	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T25	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturschalen 6 cm, 10 cm, 15 cm	Nunc A/S, Dänemark
Zentrifugen-Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht



Zentrifugenröhrchen Rundboden (für FACS) 4,5ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
6-Loch Multischale	Nunc A/S Dänemark
24-Loch Multischale	Nunc A/S, Dänemark
96-Loch Multischale	Nunc A/S, Dänemark

### 3.14 Geräte

**Tabelle 3.14 Geräte**

<b>Name</b>	<b>Typ/Herkunft</b>
Anaerobier Topf	Oxoid GmbH
Brutschrank Heraeus CO <sub>2</sub> Incubator BBD 6220	ThermoFisher Scientific, Langenselbold
Entwicklermaschine	Agfa CP1000
Feinwaage	Sartorius Talent TE 2145
Gefrierschränke	Liebherr Premium
Geldokumentationssystem	Bio-Rad Multi-Imager Fluor S und Densitometer GS-800
Gelapparaturen & Tankblotting Mini-Gele	Bio-Rad Mini-Protean 3 System
Grobwaage	Sartorius LP820
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Hochspannungsnetzgerät E802	CONSORT, Turnhout, Belgien
Inkubatoren	Heraeus BBD 6220
Inversmikroskop	Nikon Eclipse TS 100
Kleinschüttler MS 2 Minishaker	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen
konfokales Lasermikroskop (LSM)	Zeiss LSM 510
Kühlschränke	Liebherr ProfiLine
LSRII	Becton Dickinson, USA
Mikrotiterplatten-Leser	GENios Tecan
Odyssey® CLx	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
PCR-Maschine PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
Petrishalen Drehtisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Photometer	Eppendorf BioPhotometer 20
Pipettus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
Power Supply	Consort E802, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Präzisionswaage Talent TE 2145	Sartorius AG, Göttingen
Schüttler	Polymax 2040 Heidolph Instruments
Sicherheitswerkbank SterilGARD® III Advance°	The Baker Company, Labotect, Göttingen
Sonotrode Mikropitze MS72	Bandelin electronic, Berlin

Sonotrode Titanteller TT13	Bandelin electronic, Berlin
Sterilbank	Sterilgard III Advance
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort
Tiefkühlschrank	Liebherr Premium, LIEBHERR Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Tiefkühlschrank (-80°C)	Hereaus hera freeze
Tischzentrifuge	Eppendorf 5417R
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD2200, Bandelin Electronic, Berlin
Ultrazentrifuge	TL-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortexer	IKA Werke MS2 Minishaker
Zentrifuge	Eppendorf 5810R

### 3.15 Computer und Software

**Tabelle 3.15 Computer und Software**

Name	Herkunft
Adobe Reader 7.0	Adobe Systems GmbH, München
Corel Photo-Paint 11	Corel™ GmbH, Unterschleißheim
Dell Optiplex GX 620	Dell GmbH, Frankfurt am Main
LSM Image Browser, Release 3.2	Carl Zeiss AG, Jena
LSR FACS DIVA	Becton Dickinson, USA
Microsoft Office 2003	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
Odyssey 2.1	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Referance Manager 10	Thomson Reuters
Vector NTI® 9.0	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Windows XP professional	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
Software Programme zur Identifizierung der c-Abl an T <sup>735</sup> -phosphorylierenden Kinasen:	
NetphosK	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK</a> (2009)
ScanSite	<a href="http://scansite.mit.edu">http://scansite.mit.edu</a> (2009)
KinasePhos2.0	<a href="http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw">http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw</a> (2009)
GPS	<a href="http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps_web">http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps_web</a> (2009)

---

## 4. Methoden

---

### 4.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

In dieser Arbeit wurden die adhärent wachsenden Zelllinien AGS, MCF-7 und MKN-28 verwendet. Desweiteren wurden die stabil transfizierten Zelllinien AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> verwendet, die im Zuge dieser Arbeit etabliert wurden. AGS und MKN-28 Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FKS, 1% Glutamin bei 5 % CO<sub>2</sub>, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Inkubationstemperatur von 37°C in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Kultivierung der AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> unterschied sich lediglich durch die Zugabe des Antibiotikums G418 [1,2 g/l]. MCF-7 Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS, 1% Glutamin bei 10% CO<sub>2</sub>, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Inkubationstemperatur von 37°C kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und für drei Minuten mit Trypsin/EDTA behandelt. Nach dem Ablösen der Zellen wurde dieser Vorgang durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:4 in eine neue Zellkulturflasche passagiert und mit 20 ml des entsprechenden Mediums aufgefüllt. Für Infektionsexperimente wurden die Zellen auf Zellkulturschalen, für Immunfluoreszenzstudien auf Deckgläschen oder für Migrationsstudien in spezielle Kammern ausgesät und falls notwendig 24 Stunden später transfiziert. Nach insgesamt 48 Stunden und einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen auf FKS-freies, 0,5% oder 1% FKS-haltiges Medium gesetzt und nach einer Stunde mit *H. pylori* infiziert.

#### 4.1.2 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Zellzählung in einer Neubauer improved Zählkammer. Hierzu wurden die trypsinisierten Zellen mit FKS-haltigem Medium versetzt und im Verhältnis von 1:1 Trypanblau zugegeben. Dies bewirkt eine Blaufärbung der abgestorbenen Zellen und eine Weißfärbung der noch lebenden Zellen. Unter Verwendung eines Lichtmikroskops wurden die vitalen Zellen in 4 Großquadranten der Neubauer improved Zählkammer gezählt und die Zellzahl pro ml Zellsuspension berechnet. Diese ergibt sich in diesem Fall aus dem Mittelwert der Zellzahl der 4 Quadrate multipliziert mit einem Kammerfaktor von 10.000 und einer Verdünnung von 2.

#### 4.1.3 Reverse Transfektion von siRNA

Der Einsatz von siRNA dient der Verringerung der Expression bestimmter Zielgene. Die siRNA besteht aus ribonukleinsäurehaltigen Oligonukleotiden und ist komplementär zur

mRNA des gewünschten Zielgens. Die Transfektion der siRNA erfolgte mittels siRNA Transfektionsreagenz der Firma Santa Cruz entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden für eine 6 cm Zellkulturschale 6 µl Transfektionsreagenz in 300 µl Transfektionsmedium gegeben und der Ansatz für 5 Minuten bei RT inkubiert. Gleichzeitig wurden 12 µl der 10 µM siRNA in 300 µl Transfektionsmedium gegeben und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze miteinander vermischt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Das siRNA–Gemisch wurde anschließend mit  $6 \times 10^5$  Zellen auf ein finales Volumen von 2 ml mit Transfektionsmedium aufgefüllt und für 5 -7 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Transfektionsmedium gegen 5% FKS–haltiges Medium ersetzt, die Zellen weitere 16 Stunden kultiviert und anschließend mit Plasmid–DNA transfiziert.

#### **4.1.4 Transiente Transfektion adhärenter Zellen**

Für das Einbringen der Plasmid-DNA in die Zellen wurde das Transfektionsreagenz GenJuice® entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurde pro µg DNA 2 µl GeneJuice® in 500 µl FKS-freies Medium gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Menge an verwendeter DNA betrug für 15 cm-Schalen 10 µg, 10 cm-Schalen 5 µg, 6 cm-Schalen 2 µg und für 24-Loch-Schalen 1 µg. Die Zugabe des DNA–Gemisches in das FKS–freie Zellmedium erfolgte entsprechend den Herstellerangaben für 6-8 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Zellmedium gegen 10% FKS–haltiges Medium ersetzt und die Zellen für weitere 20 Stunden inkubiert.

#### **4.1.5 Etablierung von stabil transfizierten epithelialen Zelllinien**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stabil transfizierte Zellen erzeugt. Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit den zuvor durch Restriktionsverdau linearisierten Vektoren pNTAP-B-c-Abl<sup>wt</sup>, pNTAP-B-c-Abl<sup>T735A</sup> und einem pNTAP-B Leervektor transfiziert. Hierbei wurden wie bei einer transienten Transfektion (siehe 4.1.4) 50% konfluente AGS Zellen mit linearisierten Expressionsvektoren transfiziert. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte 24 Stunden nach Transfektion unter Verwendung des Antibiotikums G418 [1,2 mg/ml] im Zellkulturmedium. Die zelltoxische Dosis G418 für Zellen ohne Resistenzgen wurde zuvor ermittelt. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte AGS Zellen mitgeführt, deren Zellkulturmedium auch mit G418 versetzt wurde. Während der Selektionierung wurde jeden Tag das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen so lange kultiviert, bis alle nicht transfizierten Zellen durch das Antibiotikum abgetötet wurden. Ab diesem Zeitpunkt war davon auszugehen, dass alle noch auf der Zellkulturschale verbleibenden Zellen das Plasmid enthielten. Diese wurden mittels Trypsin/EDTA von der Zellkulturplatte entfernt und einzeln in 96-Loch Zellkulturplatten in G418–haltigem Medium kultiviert. Die daraus

entstandenen Einzelkolonien wurden mit zunehmendem Wachstum in 48- und 24-Loch Zellkulturplatten passagiert und mittels Western Blot analysiert.

#### 4.1.6 Behandlung der adhärennten Zellen mit Inhibitoren

Für eine Identifizierung der Threoninkinase wurden Inhibitoren gegen spezifische Serin-/Threoninkinasen in Zellkultur - und *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten verwendet. Für diesen Zweck wurden die in Tabelle 4.1.1 aufgelisteten Inhibitoren zu den angegebenen finalen Konzentrationen eingesetzt.

**Tabelle 4.1.1 Verwendete Inhibitoren**

Inhibitor	Endkonzentration	Anwendung
Gö 6850	[ 1 µM]	ZK
	[ 75 nM]	IVP
	[100 nM]	IVP
Gö 6983	[ 1 µM]	ZK
Staurosporin	[ 1 µM]	IVP

Abkürzungen: ZK: Zellkultur, IVK: *in vitro* Phosphorylierungsreaktion

In Zellkulturexperimenten wurden die Inhibitoren eine Stunde vor Infektion der Zellen in das serumfreie Zellkulturmedium gegeben. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Versuch mit Zugabe von *H. pylori* mit MOI 100 für 6 Stunden gestartet (siehe 4.1.9). In *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten wurde der Inhibitor mit der entsprechenden Kinase 10 Minuten in Kinasepuffer präinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Substrates initiiert (4.3.9).

#### 4.1.7 Kultivierung von *H. pylori*

„Die Kultur von *H. pylori* erfolgte unter mikroaerophilen Bedingungen bei einer Temperatur von 37°C. Das mikroaerophile Milieu wurde mittels eines Anaerobiertopfes und eines Campi-Gen<sup>TM</sup> Bakterien-Beutels erzeugt. Zu Beginn wurden Bakterien aus einer Bakterienstammlösung mit einer Impföse auf den entsprechenden Bakterienplatten ausgestrichen und kultiviert. Nach 72 Stunden wurden Einzelkulturen mit einem feuchten Wattestäbchen abgenommen und in 3 ml PBS resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden ca. 5-10 µl ausplattiert und für weitere 48 Stunden kultiviert“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit).

#### 4.1.8 Anlegen von *H. pylori* Stammkulturen

„Für das Anlegen einer *H. pylori* Stammlösung wurden die Bakterien mit einem feuchten Wattestäbchen von der Bakterienplatte entnommen und in ein Kryoröhrchen mit 1 ml Kryomedium überführt. Diese Bakterienstammlösung wurde bei -80°C gelagert“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit).

#### 4.1.9 Infektion von Zellen mit *H. pylori*

„Für Infektionsexperimente wurden die Bakterien mit einem feuchten Wattestäbchen von der Bakterienplatte entnommen und in 3 ml PBS resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt, die optische Dichte bei 600 nm gemessen und die Bakterienzahl anhand einer vorhandenen Eichgerade ermittelt. Um die Zellen mit der entsprechenden Anzahl an Bakterien pro Zelle (MOI, *multiplicity of infection*) zu stimulieren, wurde für die Berechnung des Volumens der Bakteriensuspension folgende Formel angewandt“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit):

$$\text{Volumen Bakteriensuspension} = \frac{\text{Zellenzahl} \times \text{MOI}}{\text{Bakterienzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Entsprechend des jeweiligen Versuchs und des dabei verwendeten Zellkulturgefäßes wurden die in Tabelle 4.1.2 aufgeführten Zellzahlen verwendet. Diese beziehen sich auf 70% konfluente Zellen in dem jeweiligen Zellkulturgefäß.

**Tabelle 4.1.2 Zellzahl bei 70% Zellkonfluenz**

Zellkulturgefäß	Zellzahl [Zellen]
15 cm Zellkulturschale	13,1 x 10 <sup>6</sup>
10 cm Zellkulturschale	5 x 10 <sup>6</sup>
6 cm Zellkulturschale	1,2 x 10 <sup>6</sup>
24-Loch Zellkulturplatte	2,24 x 10 <sup>5</sup>
Deckgläschen (12 mm)	2,24 x 10 <sup>5</sup>
96-Loch Zellkulturplatte	2 x 10 <sup>4</sup>
Zellmigrationskammer	2 x 10 <sup>4</sup>

Für die Infektionsexperimente wurde das FKS-haltige Zellkulturmedium durch FKS-freies, 0,5% oder 1% FKS-haltiges Zellkulturmedium ersetzt und nach einer Stunde entsprechend der eingesetzten MOI die Infektion durch Zugabe der Bakterienlösung gestartet. Nach Applikation der Bakterienlösung in das Zellkulturmedium wurden die Zellen erneut bei 95% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für den jeweiligen Zeitraum inkubiert. Die Infektion der Zellen wurde mittels eines Inversmikroskops dokumentiert und nach Ablauf der Infektionszeit durch zweimaliges Waschen mit 10 ml eiskaltem PBS terminiert..

#### 4.1.10 Stimulierung von Zellen

Neben einer Infektion der Zellen mit *H. pylori* wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen stimuliert (siehe Tabelle 4.1.3), die bestimmte Serin- /Threonin Kinasen aktivieren. Dies diente neben dem Einsatz von spezifischen Inhibitoren der Identifizierung von Kinasen, die c-Abl an Thr<sup>735</sup> phosphorylieren. Die in Tabelle 4.1.3 aufgeführten Stimulanzien wurden in den angegebenen Endkonzentrationen in das FKS freie Zellkulturmedium gegeben und für die entsprechenden Zeiträume inkubiert. Die Stimulierung wurde durch zweimaliges Waschen mit 10 ml eiskaltem PBS terminiert.

**Tabelle 4.1.3 Verwendete Stimulanzien**

Substanz	Wirkung in der Zelle	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Stress- und Apoptoseinduktion	250 µM
		500 µM
MnCl <sub>2</sub>	Aktivierung von Integrinen	250 µM
		500 µM
PMA	Aktivierung von PKCs	100 nM
Sorbitol	Osmotischer Stress	500 mM

#### 4.1.11 Zellmigrationsexperimente

Der Einfluss der c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung auf das Migrationsverhalten der infizierten Zellen wurde in dieser Arbeit mittels eines Zellmigrationsassays untersucht. Zu diesem Zweck wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 10% FKS-haltigem Zellkulturmedium in spezielle Kammern mit einer Membran an der Unterseite ausgesät. Diese Membran enthielt Poren mit einem Durchmesser von 8 µM, was ein Passieren der migrierenden Zellen durch die Poren von der Ober- auf die Unterseite der Membran ermöglichte. 48 Stunden nach Aussaat der adhären Zellen wurde das Zellkulturmedium durch 1% FKS-haltiges Medium ersetzt und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Infektion der Zellen mit *H. pylori* erfolgte mit MOI 50 für 24 Stunden. Das Experiment wurde durch zweimaliges Waschen der Kammer mit PBS terminiert und die sich auf der Oberseite der Membran befindlichen Zellen mittels eines feuchten Wattestäbchens entfernt. Die Zellen, die während des Versuches durch die Poren auf die Unterseite der Membran migrierten, wurden unter Verwendung einer Methylenblaulösung (Giemsa) für 5 Minuten fixiert und blau angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS von der Membran entfernt und diese bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurde die Membran aus der Kammer mit Hilfe eines Skalpells entfernt, auf einen Objektträger überführt und die sich auf der Membran befindlichen Zellen mittels eines Inversmikroskops der Firma bei 5 x Vergrößerung

ausgezählt und dokumentiert. Die Durchführung der einzelnen Versuchsansätze erfolgte stets in Triplikaten.

#### 4.1.12 Zellviabilitätsmessung

Die Bestimmung der Zellviabilität und eine mögliche Erhöhung der Zellproliferation erfolgte unter Verwendung eines MTT Assays. Zu Beginn des Versuchs wurden  $1 \times 10^4$  adhären wachsende Zellen in eine 96-Loch Zellkulturplatte in 100  $\mu\text{L}$  10% FKS-haltiges Zellkulturmedium gegeben und bei 95% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  für 24 Stunden kultiviert. Eine Stunde vor Infektion wurde das Zellkulturmedium gegen FKS freies Medium ersetzt und im Anschluss daran die Zellen für den entsprechenden Zeitraum stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Reagenz A, die das Substrat MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zoliumbromid) beinhaltet, in einem Verhältnis von 1:10 in das Zellkulturmedium gegeben und bei 95% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  für zwei Stunden inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Umwandlung des gelben Farbstoffes MTT aufgrund der mitochondrialen Aktivität der vitalen Zellen in das violett erscheinende Formazan. Durch Zugabe des Reagenz C wurde die Reaktion abgestoppt, das violett-farbige Präzipitat durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gelöst und die Absorption bei 560 nm in einem Mikrotiterplattenleser bestimmt. Die Durchführung der einzelnen Versuchsansätze erfolgte mindestens in Quadruplikaten.

#### 4.1.13 Bestimmung apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung und anschließender Messung in einem Durchflusszytometer (FACS: Fluorescence-Activated Cell-Sorting)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung von Zellen basierend auf ihren physikalischen und molekularen Eigenschaften. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Apoptoserate der Zellen während einer *H. pylori* Infektion mittels Oberflächenanfärbung der apoptotischen Zellen mit Annexin-V-PE und anschließender Messung im Durchflusszytometer bestimmt. Verlust der Membranintegrität ist charakteristisch für ein frühes Stadium der Apoptose von epithelialen Zellen. Hierbei wird das sich in vitalen Zellen auf der inneren Seite der Lipidmembran befindliche Phospholipid Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Zellmembran verlagert und ist somit für extrazelluläre Stoffe zugänglich. Das extrazellulär zugängliche PS in frühen Stadien der Apoptose macht man sich bei der Annexin-V Färbung zu Nutze, da das Protein Annexin eine hohe Affinität zu Phospholipiden besitzt. Die Bindung von Annexin-V basiert auf dem Vorhandensein von Calcium. Das in dieser Arbeit verwendetet Annexin-V war zudem mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt, so dass die Anzahl der durch Annexin-V-PE markierten apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers im PE-Kanal erfasst werden konnte.



Für den Versuch wurden AGS Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden EGFP-Plasmiden für 7 Stunden transfiziert (4.1.4). Nach insgesamt 48 Stunden und einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen eine Stunde vor Versuchsbeginn auf FKS-freies Medium gesetzt und anschließend mit *H. pylori* entsprechend der MOI, PMA oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die jeweiligen Zeiträume stimuliert. Der Versuch wurde durch zweimaliges Waschen mit 10 ml eiskaltem PBS terminiert, wobei die Überstände in einem 50 ml Schraubdeckelgefäß auf Eis aufbewahrt wurden. Die nächsten Versuchsschritte wurden alle bei 4°C durchgeführt. Die sich noch auf der Zellkulturschale befindlichen Zellen wurden mit 1 ml Trypsin bei 37°C inkubiert und somit von der Zellkulturschale gelöst. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von 10 ml 10% FKS haltigem Medium abgestoppt und die Zellen ebenso dem 50 ml Schraubdeckelgefäß zugeführt. In einem nächsten Schritt wurden die Zellen bei 4°C, 600 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 10 ml PBS resuspendiert und erneut bei 4°C, 600 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in 1 ml einfach Bindungspuffer aufgenommen und 300 µl der Zelllösung in ein FACS-Röhrchen überführt. Diesem wurden 5 µl Annexin-V-PE zugeführt und der gesamte Ansatz bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Da es sich in diesem Versuch um eine Doppelfärbung durch die Transfektion eines grün-leuchtenden Proteins und die Annexin-V-PE Markierung handelte, wurden für die Kompensation der beiden Signale während der Messung folgende Kontrollen mitgeführt:

- A.)** nicht stimulierte pEGFP-transfizierte AGS Zellen zur Bestimmung der transfizierten Zellen im Durchflusszytometer ohne Annexin-V-PE
- B.)** nicht stimulierte oder transfizierte AGS Zellen als Negativkontrolle ohne Annexin-V-PE
- C.)** UV bestrahlte nicht transfizierte AGS Zellen als Positivkontrolle für die Annexin-V-PE Färbung mit Annexin-V-PE

Für die UV Bestrahlung wurden die Zellen am Tag der Stimulierung mit einem UV Radiator der Firma im Automatikprogramm zweimal bestrahlt und anschließend für 24 Stunden im Inkubator weiter kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurden zunächst die mitgeführten Kontrollen gemessen und kompensiert. Im Anschluss daran wurden die Proben gemessen indem bei jedem Versuchsansatz 5000 GFP-exprimierende Zellen im FITC-Kanal ausgezählt wurden und deren Annexin-V-PE Färbung im PE-Kanal bestimmt wurde. Die Durchführung der einzelnen Versuchsansätze erfolgte immer in Triplikaten.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus Gesamtzellextrakten der stabil transfizierten Zelllinien AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® RNAII Isolation Kits der Firma Macherey - Nagel entsprechend der Angaben des Herstellers. Hierbei wurden die Zellen in speziellen Puffern aufgenommen, die zu einer Inaktivierung von RNAsen führen und somit die zu isolierende RNA stabilisieren. Die Isolierung der RNA erfolgte über Bindung an Silicia-Membranen wohingegen Verunreinigungen wie Proteine und DNA ausgewaschen wurden und somit die reine RNA aus den Membranen eluiert werden konnte.

### 4.2.2 cDNA Synthese mittels RT-PCR

Die Synthese der cDNA aus der isolierten RNA erfolgte über die Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits der Firma Fermentas und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 4.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die spezifische Amplifikation und Vermehrung des gewünschten DNA Abschnittes erfolgte mittels einer PCR. Hierbei wird in sich wiederholende Zyklen von Denaturierung des DNA-Moleküls, Hybridisierung der spezifischen Primer an die komplementäre DNA und anschließende Elongation der Primer durch die DNA-Polymerase der gewünschte DNA-Abschnitt vervielfältigt. Die PCR wurde in der in Tabelle 4.2.1 aufgeführten Zusammensetzung angesetzt und in der PCR-Maschine zu den in Tabelle 4.2.2 angegebenen Konditionen je nach PCR-Primer durchgeführt.

**Tabelle 4.2.1 Zusammensetzung der PCR Reaktion**

Reagenz	Volumen
cDNA [20 ng/μl]:	1 μl
Phusion Reaktionspuffer [5 x]:	4 μl
Forward Primer [10 pmol/ml]:	1 μl
Reverse Primer [10 pmol/ml]:	1 μl
dNTP-Mix [10 mM]:	0,4 μl
Phusion Polymerase [2 U/μl]:	0,2 μl
H <sub>2</sub> O bidest	12,4 μl

Tabelle 4.2.2 Schritte der PCR

Primer: GAPDH			
PCR-Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	5	95	1
Denaturierung	1	95	1
Hybridisierung	1	59	1
Elongation	1	72	1
Finale Elongation	10	72	1
Primer: pNTAP-B			
PCR-Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	5	95	1
Denaturierung	1	95	1
Hybridisierung	1	55	1
Elongation	2,5	72	1
Finale Elongation	10	72	1

#### 4.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Die Überprüfung der Größe der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode wandert die negativ geladene DNA in dem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Das Laufverhalten wird dabei durch die Größe des DNA-Fragments bestimmt, so dass kleinere Fragmente schneller in der Agarosematrix migrieren als größere. Die Visualisierung erfolgt über die Zugabe von sich in die DNA einlagernden Substanzen wie Ethidiumbromid und anschließender Visualisierung in einem UV-Transilluminator. In diesem Fall wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer gelöst und daraus ein 1% Agarosegel hergestellt. Nach Auspolymerisieren wurde der PCR Ansatz oder bei einem Restriktionsverdau eines Plasmids 1 µg DNA mit Probenauftragspuffer versetzt und in dem Agarosegel bei 100 V für ca. 1 Stunde aufgetrennt und auf dem UV-Transilluminator visualisiert und dokumentiert. Die Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines mitgeführten DNA-Markers.

#### 4.2.5 Gelextraktion von DNA

Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte unter Verwendung der NucleoSpin® Extract II Kits der Firma Macherey-Nagel entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Extraktion basiert auf der Bindung der DNA an eine Silicia-Membran unter Verwendung spezifischer Puffer, mehrfacher Waschung der Membran und der anschließenden Eluierung der aufgereinigten DNA mittels destillierten Wassers.

#### 4.2.6 Vermehrung von Plasmid-DNA

Die Vermehrung der Plasmid-DNA wurde in chemisch-kompetenten *E. coli* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden chemisch-kompetente *E. coli* des Stammes DH5 $\alpha$  auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu$ g Plasmid-DNA gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin folgten 90 Sekunden Hitzeschock bei 42°C und anschließend eine Minute Inkubation auf Eis. Der gesamte Ansatz wurde mit 1 ml LB-Medium versetzt und bei 37°C, 200 rpm für eine Stunde geschüttelt. Im Anschluss daran wurden 150  $\mu$ l des Ansatzes auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C über Nacht selektioniert. Hierbei betrug die Konzentration von Ampicillin 100  $\mu$ g/ml und Kanamycin 50  $\mu$ g/ml in dem LB-Agar. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienkolonien in 6 ml LB-Medium mit jeweils 100  $\mu$ g/ml Ampicillin oder 50  $\mu$ g/ml Kanamycin bei 37°C, 200 rpm für 8 Stunden geschüttelt und zum Animpfen einer 250 ml Flüssigkultur verwendet. Diese wurde über Nacht inkubiert und die Bakterien am nächsten Tag mittels Zentrifugation bei 4°C, 6000 x g für 20 Minuten pelletiert.

#### 4.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den transformierten *E. coli* erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Maxi Kits der Firma Macherey-Nagel entsprechend der Anleitung des Herstellers. Hierbei basiert die Isolierung der DNA auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Neutralisation des Lysates in salzhaltigen Puffern und Bindung der DNA an eine Silicia-Membran. Durch mehrmaliges Waschen wird die DNA aufgereinigt, mit Isopropanol aus der Membran eluiert, mittels Ethanol entsalzt und in destilliertem Wasser gelöst.

#### 4.2.8 Mutagenese von Plasmid-DNA

Die phosphorylierungsresistente c-Abl<sup>T735A</sup> Mutante wurde durch eine Mutagenese des Threonin<sup>735</sup> (ACG) zu einem Alanin<sup>735</sup> (GCG) hergestellt. Hierbei wurde die Mutagenese des c-Abl<sup>wt</sup> Plasmids unter Verwendung des QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für diese Mutagenese-Reaktion wurden spezifische Primer bei der Firma MWG Operon in Auftrag gegeben und zu den in Tabelle 4.2.3 beschriebenen Bedingungen die gewünschte Mutagenese über eine PCR durchgeführt.

**Tabelle 4.2.3 Schritte der Mutagenese-PCR**

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	2 min	95	1
Denaturierung	20 sec	95	1
Hybridisierung	10 sec	60	1
Elongation	2,5 min	62	1
Finale Elongation	5 min	62	1

Im Zuge der Mutagenese wurde das ursprüngliche c-Abl<sup>wt</sup> Plasmid durch eine Methylierung markiert. Nach Abschluss der Mutagenese Reaktion wurde das methylierte c-Abl<sup>wt</sup> Plasmid mit dem Enzym *DpnI* bei 37°C für 5 Minuten verdaut und das mutagenisierte c-Abl<sup>T735A</sup> Plasmid in *E. coli* transformiert. Die Überprüfung der Mutagenese erfolgte über eine Sequenzierung der Firma Eurofins MWG Operon.

#### 4.2.9 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Im Zuge dieser Arbeit wurden die DNA-Plasmide pNTAP-B-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-B-c-Abl<sup>T735A</sup> kloniert. Zu diesem Zweck wurde aus den Vektoren pcDNA3-Flag-c-Abl<sup>wt</sup> und pcDNA3-Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> die c-Abl Sequenz mittels Restriktionsverdau mit BamH1 und EcoR1 ausgeschnitten. Die Zusammensetzung dieses Restriktionsverdaus ist in Tabelle 4.2.4 aufgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermomixer bei 37 °C für eine Stunde und wurde durch Hitzeinaktivierung bei 65°C für fünf Minuten terminiert. Die entstandenen Schnittstellen wiesen aufgrund der ausgewählten Enzyme überhängende Enden auf (*sticky ends*). Da eine Religierung bei der Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen nicht zu erwarten war, wurde der Restriktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen, die gewünschte Bande ausgeschnitten und aus dem Agarosegel eluiert (4.2.5). In einem nächsten Schritt wurde die Ligation des c-Abl-Fragments mit dem gewünschten Leervektor initiiert (4.2.10).

**Tabelle 4.2.4 Restriktionsverdau *sticky end***

Plasmid-DNA: Flag-c-Abl <sup>wt</sup> , Flag-c-Abl <sup>T735A</sup> , pNTAP-B-Leervektor	
Reagenz	Volumen
cDNA [2,5 µg/µl]:	2 µl
NEB Reaktionspuffer [10 x]:	5 µl
BamH1 [20 U/µl]	2 µl
EcoR1 [20 U/µl]	2 µl
BSA [100 x]	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest	38,5 µl

Die Linearisierung der Plasmide pNTAP-B-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-B-c-Abl<sup>T735A</sup> für die anschließende stabile Transfektion in AGS Zellen erfolgte unter Verwendung des Enzyms BstBI der Firma NEB. Die Reaktion wurde bei 65 °C für 12 Stunden in einem Thermomixer durchgeführt. Um das Religieren der entstandenen glatten Enden (*blunt end*) zu verhindern, wurde nach Abschluss der Reaktion dem Ansatz das Enzym Antarktische Phosphatase zugegeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Zugabe der Antarktischen Phosphatase bewirkt das Entfernen der Phosphatgruppen an den entstandenen Schnittstellen und somit ein Religieren der beiden DNA-Enden.

**Tabelle 4.2.5 Restriktionsverdau *blunt end***

<b>Plasmid-DNA:</b> pNTAP-B-c-Abl <sup>wt</sup> , pNTAP-B-c-Abl <sup>T735A</sup> , pNTAP-B-Leervektor	
<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
cDNA [1 µg/µl]:	20 µl
NEB Reaktionspuffer [10 x]:	5 µl
BstBI [20 U/µl]	5 µl
H <sub>2</sub> O bidest	20 µl

Am Ende der Reaktion wurde das Enzym bei 65 °C für 5 Minuten inaktiviert. Die Reaktion wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, aus dem Gel eluiert (4.2.5) und stabil in AGS Zellen transfiziert (4.1.5).

#### 4.2.10 Ligation von Plasmid DNA

In diesem Schritt wurden die DNA-Fragmente c-Abl<sup>wt</sup> und c-Abl<sup>T735A</sup> in den linearisierten pNTAP-B-Leervektor (4.2.9) integriert. Die einzusetzende Menge an DNA-Fragment wurde in Abhängigkeit von der Größe des Fragments und dem verwendeten Leervektor anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{DNA-Fragment [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{DNA-Fragment [kb]}}{\text{Vektor [kb]}} \times V$$

V steht in diesem Fall für das Verhältnis Vektor zu DNA-Fragment, was in diesem Fall 1:3 gewählt wurde. Vor der eigentlichen Ligation wurde der Ansatz bei 68 °C für 30 Sekunden erhitzt, um eine Linearisierung der DNA-Fragmente und des Vektors zu erreichen. Im Anschluss daran wurde die Ligation in einem Thermomixer bei 22 °C über Nacht entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz in kompetente *E. coli* transformiert und vermehrt (4.2.6), die Plasmid-DNA isoliert (4.2.7) und durch Sequenzierung bei der Firma Eurofins MWG Operon die Richtigkeit der Ligation überprüft.

### 4.3 Arbeiten mit Proteinen

Die Proteinisolation und alle weiteren Schritte erfolgten mit eisgekühlten Lösungen und bei einer Temperatur von 4°C.

#### 4.3.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

„Die adhärennten Zellen wurden nach Zugabe einer entsprechenden Menge an Lysispuffer (siehe Tabelle 4.3.1) mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch mehrmaliges Hoch- und Herunterziehen durch eine Spritzenkanüle. Anschließend wurde das Zelllysats durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 18000 x g von Zelltrümmern befreit, der Zellüberstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Schock-Gefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit).

**Tabelle 4.3.1 Lysispuffervolumen entsprechend der Zellkulturschale**

Zellkulturschale	6 cm	10 cm	15 cm
Lysispuffer	80 µl	100 µl	150 µl

#### 4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

„Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Extrakten erfolgte nach Bradford (Bradford 1976). Diese Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an Proteinen und resultiert in einem Farbumschlag der Lösung. Dieser Farbumschlag kann mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt werden und die Proteinkonzentration anhand einer mitgeführten BSA-Eichreihe mit Standardproteinmengen ermittelt werden. Zunächst wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit Wasser verdünnt und filtriert. Zu einer Bestimmung der Proteinkonzentration wurden in 1 ml der verdünnten Bradford-Lösung 1-2 µl Proteinextrakt oder unterschiedliche Mengen an BSA (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 µg), zur Erstellung der Eichgeraden, zugegeben. Nach anschließender Messung der Absorption bei 595 nm wurde die Proteinkonzentration über die lineare Regression der BSA-Eichgerade ermittelt“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit).

#### 4.3.3 Immunpräzipitation

Die gezielte Anreicherung nativer Proteine aus Gesamtzelllysaten und die Identifizierung potenzieller Interaktionspartner (Ko-Immunpräzipitation) wird durch Anwendung einer Immunpräzipitation ermöglicht. Für die Immunpräzipitation wurden 1000 µg Gesamtzellextrakt zusammen mit 4 µg eines spezifischen Antikörpers über Nacht bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein 1:1 Gemisch aus ProteinA und ProteinG PureProteome™ Magnetic Beads Systems zweimal mit PBS gewaschen und in

Lysispuffer für zwei Stunden äquillibriert. Von diesem Gemisch wurden je 30 µl in einen Versuchsansatz gegeben und dieser erneut bei 4°C für zwei Stunden auf dem Rollrad inkubiert. Dieser Schritt diente der Bindung der ProteinA und –G beschichteten magnetischen Kügelchen an den Antikörper-Protein Komplex des Zellextrakts. Die magnetischen Kügelchen wurden mit den daran gebundenen Antikörper-Protein Komplexen durch Anlegen der Reaktionsgefäße an einen Magneten separiert und dreimal mit IP-Waschpuffer gewaschen. In einem letzten Schritt wurde der IP-Waschpuffer durch 30 µl 1fach SDS-Probenpuffer ersetzt und der Ansatz bei 95°C 7 Minuten aufgekocht und mit Hilfe des Magneten von den magnetischen Kügelchen separiert. Der Nachweis des Immunpräzipitates erfolgte über einen Western Blot.

#### 4.3.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

„Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Man bedient sich hierbei der denaturierenden Eigenschaften von SDS. Dieses geht eine Verbindung mit Proteinen ein und wandert bei der anschließenden Auftrennung im elektrischen Feld aufgrund der negativen Ladung des SDSs zur Anode. Hierbei trennt eine poröse Polyacrylmatrix den SDS-Protein-Komplex nach seinem Stokes-Radius und somit Molekulargewicht auf. Die Polyacrylmatrix besteht aus Acrylamidmolekülen, die nach Zugabe eines Radikalstarters - Ammoniumpersulfat (APS) - und eines Stabilisators - Tetramethylethyldiamin (TEMED) - die Polymerisierung dieser Moleküle bewirken. Das verwendete Puffersystem basierte auf dem Lämmli-System, jedoch ohne Glycin.

Zu Beginn der SDS-PAGE wurde ein 1,5 mm dickes Trenngel gegossen und nach dessen Auspolymerisierung mit einem Sammelgel überschichtet. In dieses Sammelgel wurden die jeweiligen Kämme der Probenauftragstaschen eingeschoben. Vor dem Auftragen der Proben in die Taschen wurden diese mit SDS-Laufpuffer gespült, um Sammelgelreste zu entfernen. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel entsprechend einer Proteinmenge von 100 µg aliquotiert, 1:4 mit 4xSDS-Probenauftragpuffer versetzt und für sieben Minuten bei 95°C denaturiert. Im Anschluss daran wurde das Sammelgel mit den Proben und 3 µl Proteinmarker beladen und bei einer Spannung von 50 V gestartet. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte bei linearer Spannung von 180 V bis zum Auslaufen der Lauffront des Markers am unteren Gelrand. Die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine erfolgte über einen vor gefärbten Proteinmarker im Trenngel. Im Anschluss daran wurden die Gele im Western Blot weiter verwendet“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit).

#### 4.3.5 Sypro Ruby Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung des SDS-Gels für Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie wurden mit einem *SYPRO® Ruby Protein Gel Stain* Kit der Firma Molecular Probes™



Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt und bis zur Messung in destilliertem Wasser aufbewahrt. Die massenspektrometrische Analyse wurde von Herrn Dr. Andreas Reuter am Paul-Ehrlich Institut durchgeführt und ausgewertet.

#### 4.3.6 Western Blot

„Das Prinzip des Western Blot-Transfers basiert auf der Übertragung von Proteinen eines SDS-Gels auf eine Membran in einem elektrischen Feld. Die Bindung der Proteine erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen an einer Nitrocellulosemembran. Über die Kopplung eines spezifischen Primär-Antikörpers und einer weiteren Bindung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundär-Antikörpers kann eine immunologische Analyse der Proteine vorgenommen werden.

Für die Durchführung des Western Blots wurde die Nitrocellulosemembran für 10 Minuten in Western Blot-Puffer äquilibriert. Der Blot wurde anschließend wie folgt in Transferrichtung aufgebaut: untere Plexiglasscheibe, Schwamm, 2 x Whatman-Papier, SDS-Gel, Nitrocellulosemembran, 2 x Whatman-Papier, Schwamm, obere Plexiglasscheibe“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit). Die Übertragung der Proteine erfolgte für zwei Stunden bei 300 mA. Nach dem Transfer wurden in einem Blockierungsschritt die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mittels LI-COR® Blocklösung für eine Stunde abgesättigt. Die Inkubation der Membran mit Primär-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Tags darauf wurde der überschüssige Antikörper in einem dreimaligen Waschschrift für jeweils 15 Minuten mit TBS-T von der Membran entfernt und diese mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper in LI-COR® Blocklösung mit 0,01% SDS und 0,1% Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgte ein erneutes Waschen und im Anschluss daran die Auswertung des Blots mittels Odyssey® Infrarot Imager der Firma LI-COR® Biosciences entsprechend den Angaben des Herstellers. „Für eine weitere Behandlung der Membran mit anderen Primär-Antikörpern wurde diese für 30 Minuten bei 56°C in Stripping-Puffer inkubiert. Bei diesem Vorgang wird die Bindung der Primär-Antikörper zu den Proteinen gelöst. Nach erneutem Waschen und Blockieren konnte die Membran mit weiteren Antikörpern inkubiert werden“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit).

#### 4.3.7 Immunfluoreszenzanalyse

„Diese Methode ermöglicht das Anfärben bestimmter Proteine in Geweben oder einzelnen Zellen mit Hilfe von Antikörpern und gibt somit Aufschluss über die Lokalisierung der Proteine in dem jeweiligen Gewebe oder Kompartiment der Zelle.

AGS Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> oder -c-Abl<sup>T735A</sup> transfiziert und mit *H. pylori*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PMA für den entsprechenden Zeitraum stimuliert. Der Versuch wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS-Dulbecco abgestoppt und die Zellen durch 20-

minütige Inkubation mit 4% PFA/BSA (Paraformaldehyd/Rinderserum-albumin) bei Raumtemperatur auf dem Objektträger fixiert. Daraufhin folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS-Dulbecco für jeweils fünf Minuten und anschließend die Permeabilisierung der Zellen durch eine 10minütige Inkubation mit 0,2% Triton-X 100/PBS bei Raumtemperatur. Diese wurde nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  für jeweils fünf Minuten abgestoppt. Um die Lokalisierung der grün fluoreszierenden c-Abl Proteine in der Zelle besser bestimmen zu können, wurde der Zellkern mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) und das Aktin-Zytoskelett mit dem Farbstoff Phalloidin 546 angefärbt. Zu diesem Zweck wurde in einer 1%igen BSA/PBS-Lösung DAPI 1:1000 und Phalloidin 1:300 beigemischt und der Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach einem letzten Waschschrift und anschließendem Fixieren der Deckgläser auf dem Objektträger mit Mowiol wurde das Präparat mittels eines konfokalen Laser-Scan Mikroskops (LSM) mit der Software LSM Image Browser der Firma Zeiss ausgewertet. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluss“ (S. Schneider, 2007 Diplomarbeit).

#### 4.3.8 Proteinexpression und Isolierung in *E. coli*

Diese Methode ermöglicht die gezielte Vermehrung von mit Glutathion-S-Transferase (GST) markierten Proteinen in einem bakteriellen Organismus mit anschließender Aufreinigung der Proteine. Hierbei bindet das GST-Protein an mit Glutathion überzogene Sepharose und ermöglicht somit eine Konzentration und Reinigung des gewünschten Proteins.

Für die Anzucht der mit pGEX6P1-c-Abl<sup>wt</sup> oder pGEX6P1-c-Abl<sup>T735A</sup> transformierten *E. coli* (BL21) wurden 15 ml TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, das Medium mit Bakterien aus einem Glycerol-Stock angeimpft und bei 37°C, 200 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wurden der Bakterienlösung weitere 300 ml TB-Medium mit Antibiotikum beigemischt und diese für drei Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Vor Zugabe des IPTGs wurde ein Aliquot (5% der Lösung) entnommen, um die Induktion der Proteinexpression anschließend im Western Blot zu dokumentieren. Nach Zugabe von 0,1 mM IPTG wurden die Bakterien bei 25°C, 180 rpm für weitere drei Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien bei 4°C, 6000 x g für 20 Minuten pelletiert, in eiskaltem PBS aufgenommen und mittels eines Titantellers TT13 bei 100% Leistung dreimal für eine Minute sonifiziert. Die Isolierung der Proteine erfolgte über Zentrifugation bei 4°C, 20000 x g für 30 Minuten. Vor der eigentlichen Aufreinigung des Proteins erfolgte ein Austitrieren der Menge an einzusetzender GST-Sepharose, die eine höchstmögliche Ausbeute ermöglicht. Hiernach wurde die entsprechende Menge an GST-Sepharose mit dem Lysat bei 4°C auf dem Rollrad über Nacht inkubiert. Im Anschluss daran wurde die GST-Sepharose dreimal mit dem 10fachen Volumen mit GST-Waschpuffer gewaschen. Die Eluierung des GST-gekoppelten

Proteins erfolgte durch Zugabe von Elutions-Puffer im Verhältnis 1:1 mit anschließender Inkubation bei 4°C auf dem Rollrad für 12 Stunden. Insgesamt wurde die Eluierung dreimal wiederholt, wobei der Überstand von allen drei Schritten gesammelt wurde und in einem letzten Schritt der Puffer mittels Dialyse gegen PBS und darin gelöster Protease Inhibitor ersetzt wurden. Die Dialyse wurde in 10 l PBS/Protease Inhibitor dreimal für zwölf Stunden durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die dialysierten Proteine aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert.

#### 4.3.9 *In vitro* Phosphorylierung

Im Zuge einer *in vitro* Phosphorylierung ist es möglich herauszufinden, ob eine bestimmte aktivierte Kinase in der Zelle in der Lage ist, ein bestimmtes Substrat *in vitro* zu phosphorylieren. Um eine mögliche Phosphorylierung von c-Abl an Threonin<sup>735</sup> durch aktiviertes PKC nachzuweisen, wurde zum einen gekauftes c-Abl und zum anderen das eigens hergestellte c-Abl<sup>wt</sup>- oder c-Abl<sup>T735A</sup>-Protein (4.3.8) als Substrat in einer *in vitro* Kinase-Reaktion verwendet. Die einzelnen Bestandteile der Reaktion sind in Tabelle 4. aufgelistet.

**Tabelle 4.3.2 Zusammensetzung der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion**

Substanz	eingesetzte Menge
ADBII Reaktions-Puffer	20 µl
PKC Lipid Aktivator	20 µl
PKC aktiv [10 ng/µl]	25 ng
Abl aktiv [100 ng/µl]	250 ng
ATP [10 mM]	200 µM
H <sub>2</sub> O bidest	auf 50 µl aufgefüllt

Bei einer Verwendung der eigens hergestellten c-Abl-Proteine wurden 5 µg eingesetzt, da diese nicht der Reinheit des gekauften c-Abls entsprachen. Um die Reaktion auf ihre Spezifität zu überprüfen, wurden verschiedene Inhibitoren verwendet. Das entsprechende Volumen wurde durch das Volumen des Reaktionspuffers angeglichen. Bei Verwendung der Inhibitoren wurden diese mit der Kinase im Reaktionspuffer mit Lipid Aktivator bei 30°C 10 Minuten präinkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von ATP und Substrat gestartet. Die Reaktion erfolgte bei 30°C für 10 Minuten entsprechend den Angaben des Herstellers und wurde durch Zugabe von 17 µl 4 x SDS-Probenpuffer und Aufkochen bei 95°C für 7 Minuten abgestoppt. Die Reaktion wurde im Anschluss mittels Western Blot visualisiert.

#### 4.3.10 Identifizierung von c-Abl Bindungspartnern mittels Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Neben der Co-Immunpräzipitation wurde mit der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (*Tandem Affinity Purification*, TAP) eine weitere Methode zur Identifizierung möglicher Protein-Bindungspartner von c-Abl angewendet. Hierbei wird das gewünschte Protein als Fusionsprotein mit zwei Proteinmarkierungen in Zellen exprimiert und über die Bindung der Proteinmarkierungen an dementsprechend markierten Sepharosekügelchen spezifisch aufgereinigt. Bei dem verwendeten InterPlay® Mammalian TAP System basiert die Aufreinigung des gewünschten Zielproteins auf einer Fusion mit einer Streptavidin- und einem Calmodulin-Proteinmarkierung. Hierbei wird in zwei Bindungsschritten das Fusionsprotein erst über Bindung der Streptavidin- Proteinmarkierungen an mit Streptavidinbindeprotein überzogene Sepharosekügelchen und anschließend der Calmodulin-Proteinmarkierungen an mit Calmodulinbindeprotein überzogene Sepharosekügelchen separiert. Zwischen den beiden Isolierungsschritten wird der somit gewonnene Proteinkomplex aus c-Abl und dessen Bindungspartnern durch mehrmaliges Waschen mit speziellen Waschpuffern immer sauberer. Am Ende der Aufreinigung kann über Auftragung der Proben auf ein SDS-Gel mit anschließender Visualisierung über Sypro Ruby die Identität der Bindungspartner massenspektrometrisch analysiert werden.

Mit Hilfe des InterPlay® Mammalian TAP Systems sollten mögliche Interaktionspartner von c-Abl während einer Infektion gastraler Zellen mit *H. pylori* identifiziert werden. Zudem sollten mögliche Unterschiede zwischen Bindungspartnern mit dem c-Abl<sup>wt</sup> und c-Abl<sup>T735A</sup> aufgezeigt werden. Aus diesem Grunde wurden die Zellen neben *H. pylori* mit PMA oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert. In einem ersten Schritt wurden AGS Zellen in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden bei einer Konfluenz von 70% mit 15 µg Plasmid-DNA transient transfiziert. Da eine größere Menge an Fusionsprotein benötigt wurde, wurden pro Ansatz 15 x 15 cm-Zellkulturschalen mit AGS Zellen ausgesät (ca. 1 x 10<sup>8</sup> Zellen pro Stimulierung). Bei der verwendeten Plasmid-DNA handelte es sich um die in dieser Arbeit klonierten pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> DNA-Konstrukte (4.2.9 und 4.2.10). 24 Stunden nach Transfektion wurden das FKS-haltige Medium gegen FKS freies Medium ersetzt. Nach einer weiteren Stunde erfolgte die Stimulierung der Zellen mit *H. pylori* mit MOI 100 für sechs Stunden oder mit PMA [100 nM] und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [500 µM] für eine Stunde. Die Stimulierung der Zellen wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS abgestoppt, die Zellen nach Zugabe von 150 µl Lysispuffer mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach dem Aufschluss der Zellen und anschließender Proteinbestimmung (4.3.1 und 4.3.2) wurde die Induktion der c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung im Western Blot mit einem anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper überprüft. Im Anschluss daran wurde die TAP-Aufreinigung entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor der

Aufreinigung wurde dem Zelllysate 7 µl β-Mercaptoethanol [14,4 M], 10 µl PMSF [100 mM] und 40 µl EDTA [0,5 M] zugegeben. Anschließend wurde den Lysaten 500 µl gewaschene Streptavidin-Sepharose (enthält 50% Streptavidin-Sepharose und 50% Streptavidin-Bindepuffer) zugefügt und der Ansatz auf dem Rollrad bei 4°C über Nacht inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1500 x g der Überstand abgenommen und das Protein-Streptavidin-Sepharosegemisch in 1 ml Streptavidin-Bindepuffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, bevor die Proteine von der Streptavidin-Sepharose eluiert wurden. Hierzu wurde dem Protein-Streptavidin-Sepharose-Gemisch 1 ml Streptavidin-Eluierungspuffer beigemischt und die Reaktion auf dem Rollrad bei 4°C für vier Stunden inkubiert. Der Überstand wurde anschließend bei 1500 x g für 5 Minuten von der Streptavidin-Sepharose separiert und mit 20 µl Streptavidin-Überstands-Supplement und 4 ml Calmodulin-Bindepuffer versetzt. Danach wurde der Überstand mit 400 µl gewaschener Calmodulin-Sepharose (enthält 50% Calmodulin-Sepharose und 50% Calmodulin-Bindepuffer) versetzt, der Ansatz auf dem Rollrad bei 4°C über Nacht inkubiert final nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1500 x g der Überstand abgenommen und das Protein-Calmodulin-Sepharosegemisch zweimal in 1 ml Calmodulin-Bindepuffer gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurde das an die Calmodulin-Sepharose gebundene Proteingemisch mit 250 µl 1 x SDS-Probenaufragspuffer versetzt und bei 95°C für 7 Minuten aufgekocht. Jeweils ein Drittel dieses Ansatzes wurde für ein SDS-Gel verwendet. Ein SDS-Gel wurde zur Anfertigung eines Western Blots verwendet, das andere wurde mit Sypro Ruby gefärbt und interessante Banden massenspektrometrisch analysiert.

#### **4.4 Bioinformatische Analysen zur Identifizierung der c-Abl an T<sup>735</sup>-**

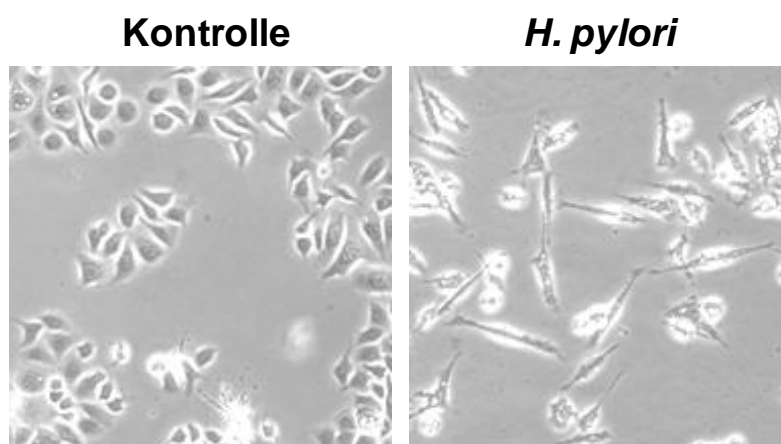
##### **phosphorylierenden Kinase**

Für eine Identifizierung der Threoninkinase, die c-Abl an Threonin<sup>735</sup> zu phosphorylieren vermag, wurde eine bioinformatische Analyse unter Verwendung verschiedener Softwareprogramme durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Aminosäuresequenz im Bereich der T<sup>735</sup>-Phosphorylierungsstelle in die Suchmaschine der Software Programme NetphosK, ScanSite, KinasePhos und GSP eingegeben und die Threoninkinasen mit signifikanten Treffern notiert. Diese bioinformatische Analyse der Phosphorylierungsstelle an c-Abl<sup>T735</sup> wurde von Bärbel Lasitschka im Zuge eines Forschungspraktikums unter meiner Betreuung durchgeführt (Lasitschka, B., 2007 Forschungspraktikum).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 *H. pylori* induziert eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in gastralen Epithelzellen

Die Infektion gastraler Epithelzellen mit *H. pylori* führt zu drastischen phänotypischen Veränderungen der infizierten Zellen. Die Kolonisierung der Zellen mit *H. pylori* resultiert in einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte, einer starken Elongation und einem erhöhten Maß an Motilität der infizierten Zellen (Abb. 5.1). Dieser für *H. pylori* charakteristische Phänotyp wird als *Scatter* Phänotyp bezeichnet (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001).

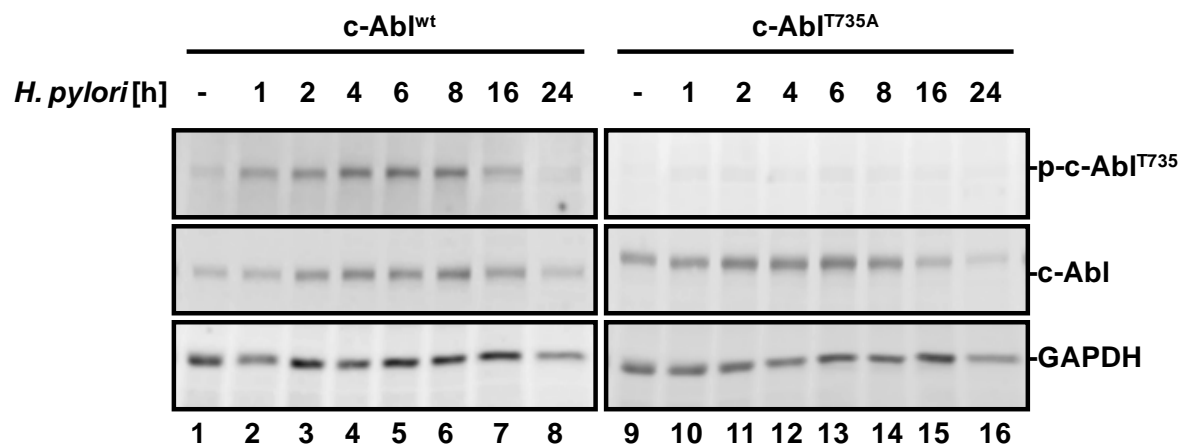


**Abbildung 5.1:** *H. pylori*-infizierte AGS Zellen (rechts) und mit sterilem Puffer kontrollbehandelte AGS Zellen sechs Stunden nach Infektion; 10fache Vergrößerung.

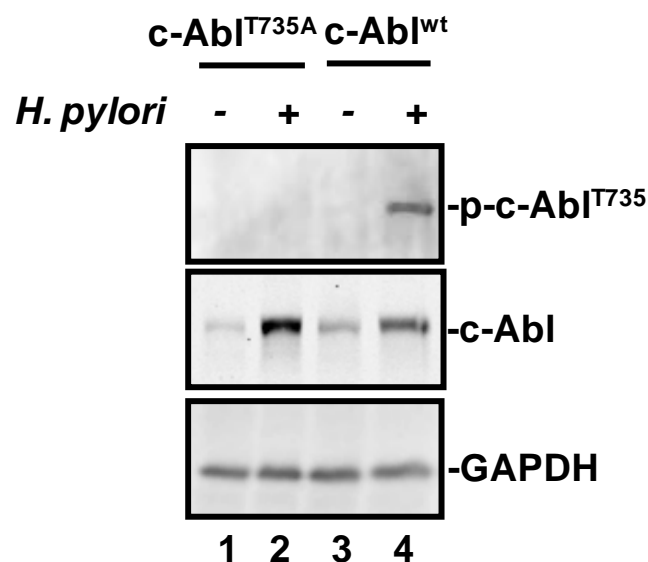
Die erhöhte Zellmotilität und das hohe Maß an Elongation basieren unter anderem auf der Aktivierung von c-Abl und der damit verbundenen Tyrosinphosphorylierung des bakteriellen Faktors CagA im Zytoplasma der *H. pylori*-infizierten Zellen (Pope *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). Neben der Tyrosinphosphorylierung von CagA und den damit verbundenen zellmigratorischen Veränderungen gibt es erste Hinweise auf einen positiven Effekt von c-Abl auf das Überleben *H. pylori*-infizierter Epithelzellen (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Die zelluläre Lokalisierung von c-Abl trägt maßgeblich zu dessen Wirkung in der Zelle bei. Eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> begünstigt die Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma der Zellen. Dies führt zu einer gesteigerten Interaktion von c-Abl mit zytoplasmatischen Reaktionspartnern und begünstigt eine antiapoptotische Wirkung von c-Abl in den Zellen (Yoshida *et al.*, 2005). 2007 wurde bereits gezeigt, dass eine Infektion mit *H. pylori* eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> induziert. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma *H. pylori*-infizierter Epithelzellen und einem daraus resultierenden positiven Effekt auf das Zellüberleben der infizierten Zellen.

Neben der in human epithelialen Adenokarzinom Zellen aus der Brustdrüse (MCF-7 Zellen) und human epithelial gastralen Adenokarzinom Zellen (MKN-28 Zellen) bereits beschriebenen Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (S. Schneider Diplomarbeit, 2007), wurde in dieser Arbeit mit AGS Zellen eine weitere human epitheliale gastrale Zelllinie untersucht. In einem initialen Experiment wurden AGS Zellen für einen Zeitraum von 24 Stunden mit *H. pylori* infiziert (MOI 100) und eine mögliche Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> im Western Blot detektiert. Eine Verstärkung des Phosphosignals wurde durch Transfektion der AGS Zellen mit einem pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> Konstrukt erzielt. Als Kontrolle wurde die Spezifität des Phosphorylierungssignals durch Transfektion der AGS Zellen mit einem c-Abl Konstrukt mit einer Mutation an Threonin<sup>735</sup> zu Alanin<sup>735</sup> überprüft. Eine Expression dieses pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup> Konstrukts resultierte in einem phosphorylierungsresistenten c-Abl-Protein an Threonin<sup>735</sup>. Die mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfizierten Zellen wiesen bereits nach einer Stunde *H. pylori*-Infektion eine schwache Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf (Abb. 5.2.A, Spur 1-2). Diese stieg im Verlauf der Infektion stetig an, erreichte zwischen sechs und acht Stunden ihr Maximum und kehrte nach 24 Stunden wieder auf das Niveau der kontrollbehandelten Zellen zurück (Abb. 5.2.A, Spur 1 und 8, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Im Gegensatz dazu blieb eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in den mit pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen zu jeder Zeit der Infektion aus (Abb. 5.2.A, Spur 9-16, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die Spezifität der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung wurde durch die Auftragung beider Lysate sechs Stunden nach der *H. pylori*-Infektion auf dem gleichen SDS-Gel im Western Blot bestätigt (Abb. 5.2.B, Spur 1-4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Ein p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signal wurde ausschließlich nach Infektion der pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit *H. pylori* detektiert (Abb. 5.2.B, Spur 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Betrachtete man die Gesamtmenge an c-Abl-Protein im Verlauf der Infektion, so war sowohl in den pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>- als auch in den pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen eine Zunahme des c-Abl-Proteins in den ersten acht Stunden der *H. pylori*-Infektion zu beobachten (Abb. 5.2.A, Spur 1-6 und 9-14, c-Abl). Eine Quantifizierung dreier unabhängiger Experimente einer 24-stündigen *H. pylori*-Infektionskinetik, in denen AGS Zellen mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert und anschließend kontroll- oder *H. pylori*-infiziert wurden, ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Die Quantifizierung der p-c-Abl<sup>T735</sup>- und c-Abl-Signale des Western Blots und anschließende Normierung dieser Werte auf die Ladekontrolle GAPDH wies einen deutlichen Unterschied zwischen dem Grad der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> und dem reinen Proteingehalt an c-Abl auf (Abb. 5.3, p-c-Abl<sup>T735</sup> graue und c-Abl schwarze Balken). Während die Menge an c-Abl (schwarze Balken) nach sechs Stunden nach Infektion auf das 2,5-fache anstieg, betrug die Intensität des c-Abl<sup>T735</sup>-Signals (graue Balken) zu diesem Zeitpunkt fast ein 14-faches seines basalen Wertes (Abb. 5.3).

A.)

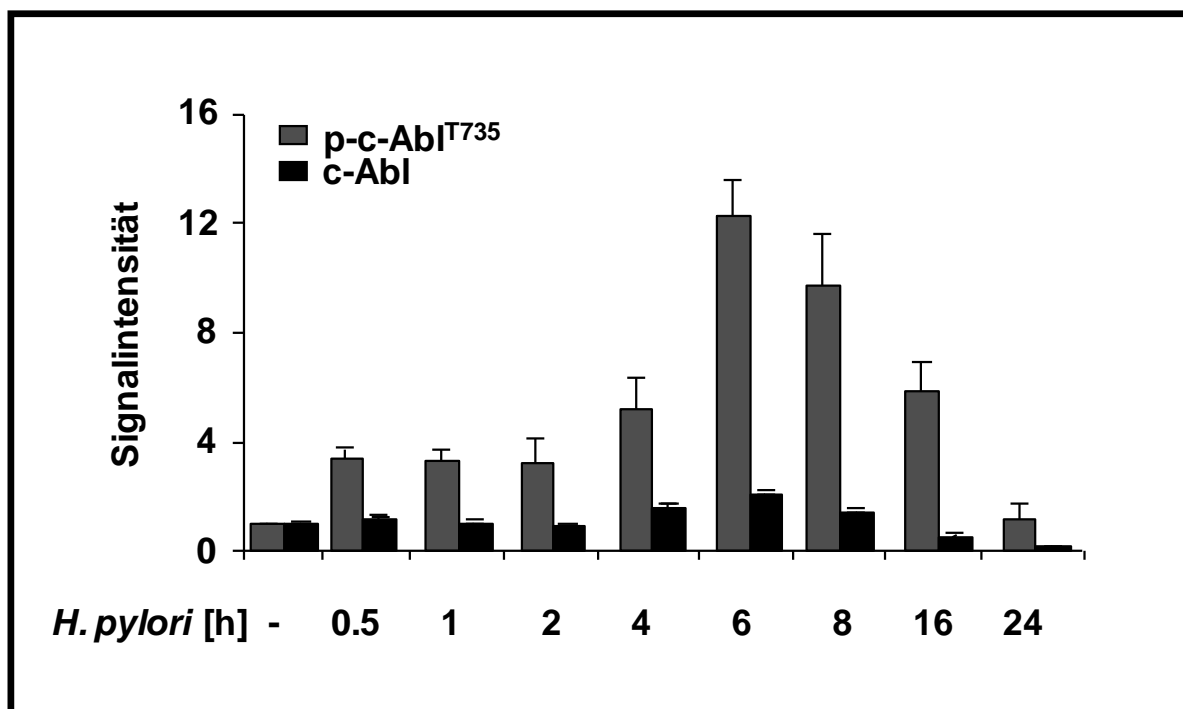


B.)



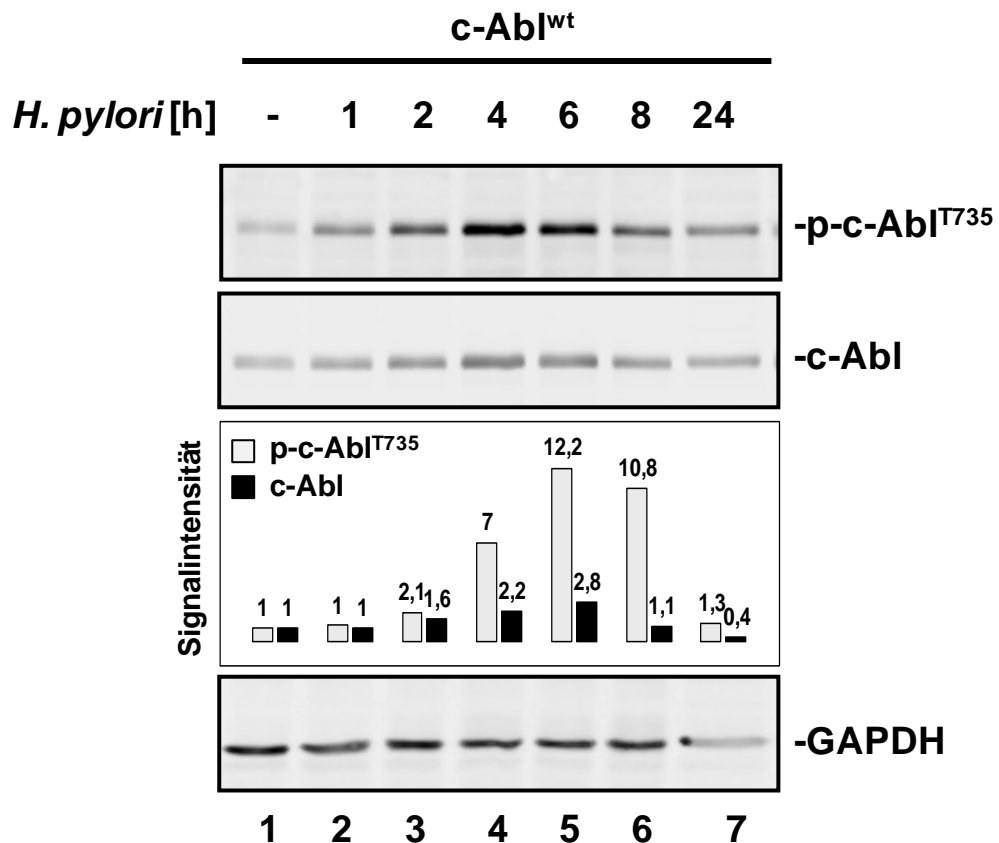
**Abbildung 5.2: Western Blot Analyse pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>- und pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter AGS Zellen während einer 24-stündigen *H. pylori*-Infektion:** Nachweis der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung anhand eines anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers. Das c-Abl-Protein wurde mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH über einen anti-GAPDH Antikörper dargestellt. **A.)** AGS Zellen mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> (Spur 1-8) oder pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup> (Spur 9-16) transfiziert und für die oben genannten Zeitpunkte mit *H. pylori*-infiziert (Spur 2-8 und 10-16) oder kontrollinfiziert (Spur 1 und 9). **B.)** Vergleich der aus Abb. 5.2.A. sechs Stunden *H. pylori*-infizierten AGS Zellen (Spur 2 und 4) oder kontrollinfizierten AGS Zellen (Spur 1 und 3) transfiziert mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> oder pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup>.





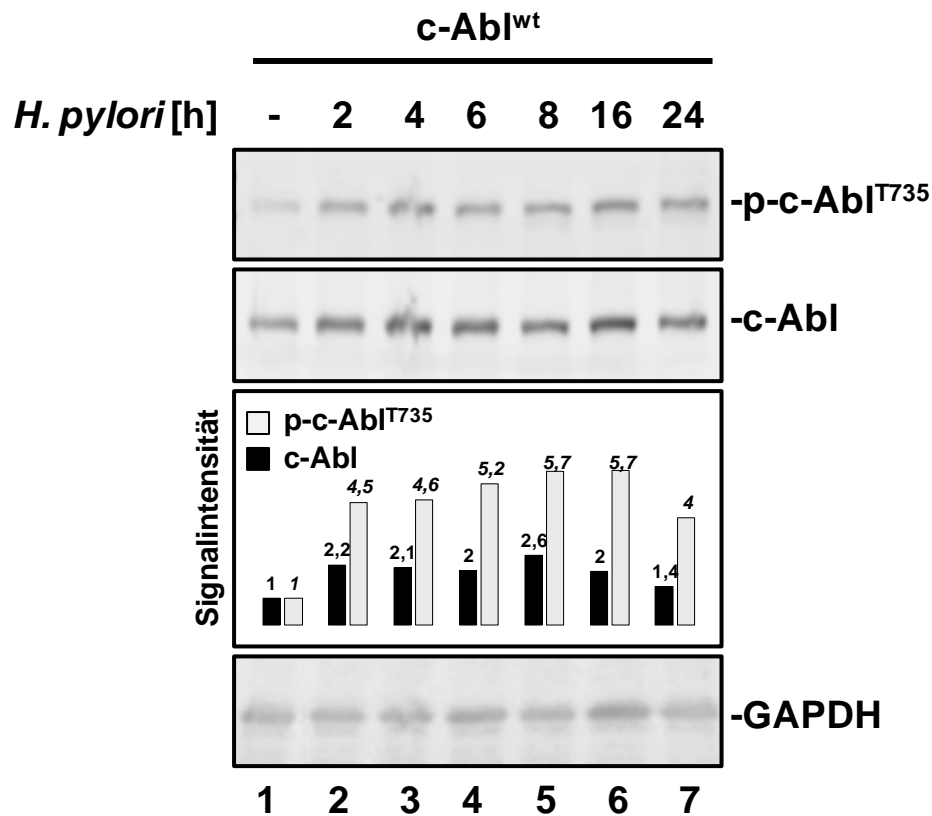
**Abbildung 5.3: Graphische Auswertung der Quantifizierung dreier Western Blots kontroll- oder *H. pylori*-infizierter pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter AGS Zellen:** Die Induktion von p-c-Abl<sup>T735</sup>, c-Abl und GAPDH wurde im Western Blot detektiert und die Signalintensitäten quantifiziert. P-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert und anhand eines Graphen dargestellt (p-c-Abl<sup>T735</sup> graue Balken, c-Abl schwarze Balken).

In pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden MCF-7 und MKN-28 Zellen wurde der Anstieg der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung und des c-Abl-Proteingehaltes mittels Western Blot ebenfalls nachgewiesen. Die Quantifizierung eines Einzelexperiments veranschaulicht den Verlauf der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> und die Akkumulierung von c-Abl in den MCF-7 und MKN-8 Zellen. In pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden MCF-7 Zellen zeichnete sich ein ähnlicher zeitlicher Verlauf des Anstiges der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung und der Akkumulierung von c-Abl während der *H. pylori*-Infektionskinetik, wie zuvor in den in den AGS Zellen beobachtet, ab (Abb. 5.4, Spur 1-7, p-c-Abl<sup>T735</sup>, c-Abl). Die Quantifizierung der Signale des Western Blots ergab mit dem 12-fachen an p-c-Abl<sup>T735</sup> ebenfalls ein Maximum nach sechs Stunden *H. pylori*-Infektion wohingegen die Akkumulierung von c-Abl das 2,8-fache betrug (Abb. 5.4, Signalintensitäten, p-c-Abl<sup>T735</sup> graue Balken, c-Abl schwarze Balken).



**Abbildung 5.4: Western Blot Analyse pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter MCF-7 Zellen während einer 24-stündigen *H. pylori*-Infektion:** Nachweis der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung anhand eines anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers. Das c-Abl-Protein wurde mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH über einen anti-GAPDH Antikörper dargestellt. Die Signalintensitäten von p-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl wurden quantifiziert, auf GAPDH normiert und als Balkendiagramm dargestellt. Graue Balken symbolisieren p-c-Abl<sup>T735</sup> und schwarze Balken c-Abl.

Die pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten MKN-28 Zellen wiesen nach acht und sechzehn Stunden *H. pylori*-Infektion ein Maximum an p-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl auf (Abb. 5.5, Spur 7, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die Phosphorylierung betrug nach acht und sechzehn Stunden *H. pylori*-Infektion das 5,7-fache und die Akkumulation von c-Abl<sup>wt</sup> acht Stunden nach Infektion das 2-fache des basalen Wertes der kontrollinfizierten Zellen (Abb. 5.5, Signalintensitäten, p-c-Abl<sup>T735</sup> graue Balken, c-Abl schwarze Balken).

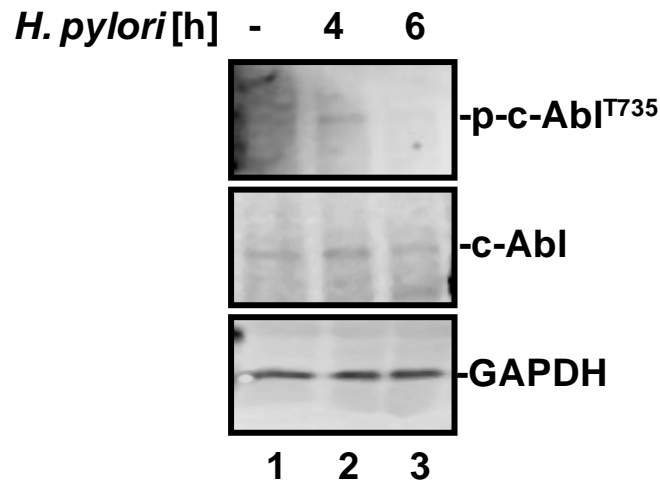


**Abbildung 5.5: Western Blot Analyse pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter MKN-28 Zellen während einer 24-stündigen *H. pylori*-Infektion:** Nachweis der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung anhand eines anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers. Das c-Abl-Protein wurde mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH über einen anti-GAPDH Antikörper dargestellt. Die Signalintensitäten von p-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl wurde quantifiziert, auf GAPDH normiert und als Balkendiagramm dargestellt. Graue Balken symbolisieren p-c-Abl<sup>T735</sup> und schwarze Balken c-Abl.

Anhand der Versuche der c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen konnte das Maximum der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung und der Akkumulation von c-Abl<sup>wt</sup> während einer *H. pylori*-Infektion bestimmt werden. Die Zeitpunkte der maximalen Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> betrugen in AGS und MCF-7 Zellen sechs Stunden und in MKN-28 Zellen zwischen acht und sechzehn Stunden. Der Zeitpunkt für das Maximum der Akkumulation von c-Abl betrug in AGS und MCF-7 Zellen sechs Stunden und in MKN-28 Zellen acht Stunden.

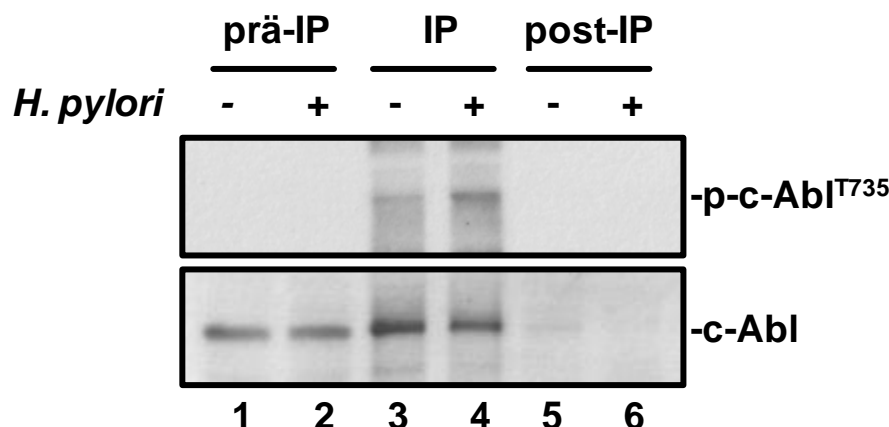
Unter Berücksichtigung dieser Zeitwerte wurde in weiteren Versuchen die Detektion von endogenem p-c-Abl<sup>T735</sup> eruiert. Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen für vier und sechs Stunden mit *H. pylori* infiziert und per Western Blot die Phosphorylierung von endogenem c-Abl detektiert (Abb. 5.6). Nach vierstündiger Infektion wurde eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> im Western Blot gemessen (Abb. 5.6, Spur 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Auf Grund des unspezifischen Hintergrundes war eine Quantifizierung des p-c-Abl<sup>T735</sup>- und c-Abl-Signals nicht möglich. Zudem wurde ein leichter Anstieg der c-Abl Gesamtproteinmenge vier

Stunden nach *H. pylori*-Infektion bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge an GAPDH beobachtet (Abb. 5.6, Spur 1 – 3, c-Abl, GAPDH).



**Abbildung 5.6: Western Blot Analyse *H. pylori*-infizierter AGS Zellen nach vier und sechs Stunden:** Nachweis der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung anhand eines anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers. Das c-Abl-Protein wurde mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH über einen anti-GAPDH Antikörper dargestellt.

Während in AGS Zellen eine Phosphorylierung an endogenem c-Abl<sup>T735</sup> direkt im Western Blot nachgewiesen werden konnte, bedurfte es in MKN-28 Zellen aufgrund der schwächeren Signalintensitäten einer Immunpräzipitation (IP) von c-Abl und anschließender Analyse per Western Blot (Abb. 5.7). Sechzehn Stunden nach *H. pylori*-Infektion der MKN-28 Zellen und anschließender IP von c-Abl mittels eines anti-c-Abl Antikörpers wurde auch in dieser Zelllinie endogen eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> detektiert (Abb. 5.7, Spur 3 und 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Während die kontrollinfizierten MKN-28 Zellen nach der IP eine leichte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> aufwiesen, wurde sechzehn Stunden nach *H. pylori*-Infektion ein deutlicheres p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signal detektiert (Abb. 5.7, Spur 3 und 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die Spezifität des p-c-Abl<sup>T735</sup> Signals nach einer IP mit *H. pylori*-infizierten Zellen wurde vorab getestet (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurde als Kontrolle das Lysat *H. pylori* infizierter MKN-28 Zellen mit dem Präimmunserum der jeweiligen Antikörperspezies (c-Abl Spezies Maus) anstelle des in der IP verwendeten spezifischen Antikörpers eingesetzt. In dem anschließenden Western Blot wurde zu keiner Zeit ein unspezifisches p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signal in der Präimmunserumkontrolle festgestellt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.7: Western Blot Analyse *H. pylori*-infizierter MKN-28 Zellen 16 Stunden nach *H. pylori*-Infektion und anschließender Immunpräzipitation von c-Abl:** Nachweis der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung anhand eines anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde c-Abl über einen anti-c-Abl Antikörper (24-11) dargestellt.

Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass *H. pylori* eine Phosphorylierung sowohl an endogenem als auch exogenem c-Abl<sup>T735</sup> induzierte. Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> unterscheidet sich in ihrer Intensität von der Akkumulierung des c-Abl-Proteins in den infizierten Zellen. Sowohl AGS als auch MCF-7 Zellen wiesen nach sechs Stunden *H. pylori*-Infektion in einem ähnlichen Zeitfenster p-c-Abl<sup>T735</sup> auf, während MKN-28 Zellen acht und sechzehn Stunden nach *H. pylori*-Infektion phosphoryliertes c-Abl<sup>T735</sup> aufwiesen.

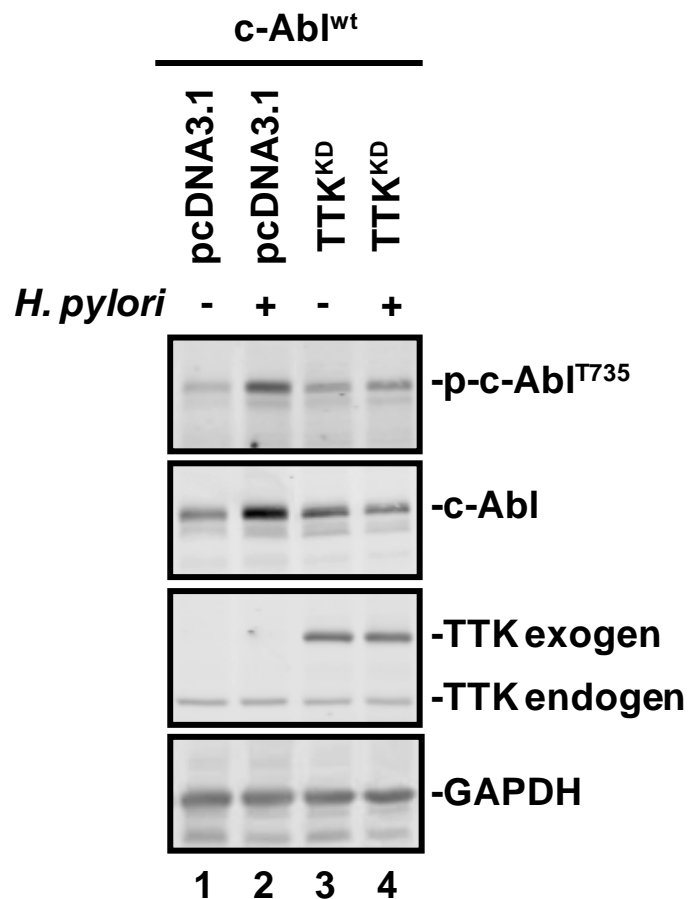
## 5.2 Welche Threoninkinase bewirkt die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in infizierten Epithelzellen?

Eine Infektion epithelialer Zellen mit *H. pylori* bewirkt die Aktivierung zahlreicher Signalwege in den infizierten Epithelzellen. Hierzu zählt neben der Aktivierung von Tyrosinkinasen wie Src, Fyn oder c-Abl auch die Aktivierung von Serin- und Threoninkinasen (Tegtmeyer *et al.*, 2010). Nachdem es sich bei der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> um eine Threoninphosphorylierung handelt, stellte sich die Frage, welche der bereits bekannten oder noch nicht in diesem Zusammenhang beschriebenen Threoninkinasen für dessen Phosphorylierung in Betracht käme. Zwar wurde bereits die Threoninkinase TTK als die c-Abl<sup>T735</sup> phosphorylierende Kinase identifiziert, jedoch wurde die Phosphorylierung in diesem Fall durch Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und nicht *H. pylori* in HeLa Zellen hervorgerufen (Nihira *et al.*, 2007). Für eine Identifizierung der Kinase der *H. pylori*-induzierten c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung musste einerseits geklärt werden, ob TTK auch in diesem Fall die

verantwortliche Kinase war und falls nicht, welche Threoninkinase die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in Abhängigkeit von *H. pylori*-induzierte. In der Literatur wurden bereits zahlreiche Interaktionen zwischen c-Abl und einer Reihe von Threoninkinasen beschrieben.

### 5.2.1 PKC phosphoryliert c-Abl an Threonin<sup>735</sup> in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen

Die Aktivität von Kinasen wird oft durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren überprüft oder durch Kotransfektion einer Plasmid-DNA der gewünschten Proteinkinase oder deren inaktiven Mutante. Desweiteren kann die Aktivität der jeweiligen Proteinkinase durch den Einsatz spezifischer siRNA in Zellen oder einer *in vitro* Phosphorylierung untersucht werden. Eine Aktivierung von TTK basiert auf der Phosphorylierung der Proteinkinase an sieben verschiedenen Phosphorylierungsstellen (Kang *et al.*, 2007). Da eine Inhibierung von TTK mit nur einem Inhibitor zu dem derzeitigen Zeitpunkt nicht möglich war, wurde der Einfluss von TTK auf die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> zunächst anhand eines Kotransfektionsexperiments überprüft (Abb. 5.8). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert. Zusätzlich wurde ein Plasmid einer Kinase-inaktiven Form von TTK (pcDNA3.1-TTK<sup>KD</sup>) (Abb. 5.8, Spur 3 und 4) oder dem entsprechenden Leervektor pcDNA3.1 in AGS Zellen koexprimiert (Abb. 5.8, Spur 1 und 2) und für sechs Stunden kontroll- oder mit *H. pylori* infiziert. Die Detektion sowohl des endogenen als auch des exogenen TTK-Proteins erfolgte mit dem gleichen TTK Antikörper. Das überexprimierte exogene TTK<sup>KD</sup> wies aufgrund seines LAP-Fusionsproteins eine etwas größere Bandengröße auf als das endogene TTK-Protein (Abb. 5.8, Spur 1–4, TTK). Betrachtete man das Niveau an p-c-Abl<sup>T735</sup> in den verschiedenen kotransfizierten Zellen vor und nach Infektion mit *H. pylori*, so war deutlich eine Induktion der Phosphorylierung nach *H. pylori* Stimulierung in c-Abl<sup>wt</sup>/pcDNA3.1-transfizierten Zellen zu verzeichnen (Abb. 5.8, Spur 1 und 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Im Gegensatz dazu wies die Koexpression von pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>/pcDNA3.1-TTK<sup>KD</sup> eine Minderung der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> sechs nach Infektion mit *H. pylori* in den gastralen Epithelzellen auf (Abb. 5.8, Spur 3 und 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Neben der Verminderung der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung wurde ein geringerer Gehalt an c-Abl in den pcDNA3.1-TTK<sup>KD</sup>-exprimierenden AGS Zellen beobachtet (Abb. 5.8, Spur 3 und 4, c-Abl). Als Kontrolle für die gleichmäßige Auftragung an Gesamtprotein diente GAPDH (Abb. 5.8, Spur 1-4, GAPDH).



**Abbildung 5.8: Western Blot Analyse sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>/pcDNA3.1-Leervektor- oder pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>/pcDNA3.1-TTK<sup>KD</sup>-transfizierter AGS Zellen:** Die Phosphorylierung von c-Abl<sup>T735</sup> wurde mit einem spezifischen anti-phospho-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper (p-c-Abl<sup>T735</sup>) detektiert. Der Nachweis von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl Antikörper (24-11) und TTK wurde mittels anti-TTK nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

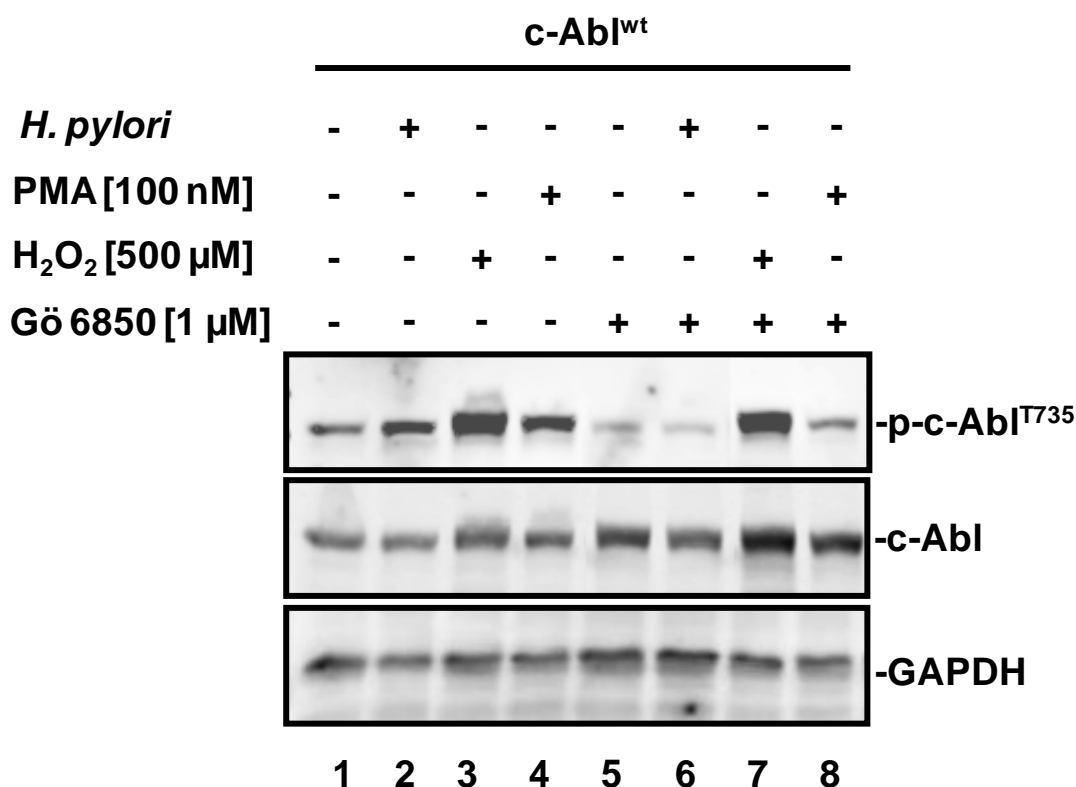
Anhand der Koexpression von pcDNA-c-Abl<sup>wt</sup> und pcDNA3.1-TTK<sup>KD</sup>, beziehungsweise pcDNA-c-Abl<sup>wt</sup> und pcDNA3.1-Leervektor konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von kinaseinaktivem TTK mit einer geringeren Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> als auch der Gesamtproteinmenge an c-Abl sechs Stunden *H. pylori*-Infektion einhergeht.

Neben der Koexpression von pcDNA3.1-TTK<sup>KD</sup> wurde *in silico* mittels verschiedener Software Programme nach einer Kinase gesucht, die c-Abl an T<sup>735</sup> zu phosphorylieren vermag (Lasitschka Forschungspraktikum, 2007). Die Analyse ergab zwei signifikante Treffer, die Proteinkinase B (PKB) und die Calmodulin-abhängige Kinase II (CAM II), dazu mit nicht-signifikanten Bindungsmaß die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Casein Kinase (CKI), Proteinkinase A (PKA), Cyclin-abhängige Proteinkinase 2 (cdc2), G-Proteingekoppelte Rezeptorkinasen (Grk), AMP-aktivierte Proteinkinasen (AMPK) und Serum und Glucocorticoid-induzierbare Kinasen (SGK) (Lasitschka Forschungspraktikum, 2007).

Desweiteren wurden die in der Literatur bereits beschriebenen Interaktionen von c-Abl mit einer Reihe von Threoninkinasen mit einbezogen. Vergleich man diese mit den Threoninkinasen, die während einer *H. pylori*-Infektion aktiviert wurden, so rückten die Serin- / Threoninkinasen der PKC-Familie in den Fokus der Untersuchungen (Yuan *et al.*, 1998; Nozawa *et al.*, 2004). Die Ergebnisse der Infektion mit *H. pylori* unter Verwendung spezifischer Inhibitoren gegen mögliche Threoninkinasen, die eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> bewirken könnten, zeigten nur bei einer Kinasefamilie eine eindeutige Inhibierung der *H. pylori*-induzierten Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (Abb. 5.9 zeigt exemplarisch nur das Ergebnis des PKC-Inhibitors). Hierbei handelte es sich um den PKC-Inhibitor Gö6850. Eine funktionelle Interaktion unabhängig von *H. pylori* zwischen PKC<sup>δ</sup> und c-Abl wurde mehrfach in der Literatur beschrieben. So wurde PKC<sup>δ</sup> im Zuge ionisierender Strahlung von c-Abl tyrosinphosphoryliert (Yuan *et al.*, 1998).

Abbildung 5.9 veranschaulicht die Wirkung von Gö6850 auf die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>. AGS Zellen wurden mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert, mit dem PKC Inhibitor Gö6850 [1 µM] für eine Stunde präinkubiert (Abb. 5.9, Spur 5-8) und im Anschluss daran für sechs Stunden kontroll- (Abb. 5.9, Spur 1 und 5) oder mit *H. pylori* (MOI 100) infiziert (Abb. 5.9, Spur 2 und 6). Neben der Infektion der Zellen mit *H. pylori* wurden diese nach Behandlung mit dem Inhibitor mit dem PKC Aktivator Phorbol-12-Myristol-13-Acetat (PMA) [100 nM] (Abb. 5.9, Spur 4 und 8) oder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [500 µM] (Abb. 5.9, Spur 3 und 7) für jeweils eine Stunde stimuliert. Die Zellen, die nicht mit Inhibitor behandelt wurden, wiesen eine erhöhte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> sechs Stunden nach Infektion mit *H. pylori* auf (Abb. 5. 9, Spur 1 und 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Während eine einstündige Stimulierung mit PMA eine vergleichbare Phosphorylierung induzierte, führte die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich dazu zu einem stärkeren p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signal (Abb. 5.9, Spur 3 und 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>).



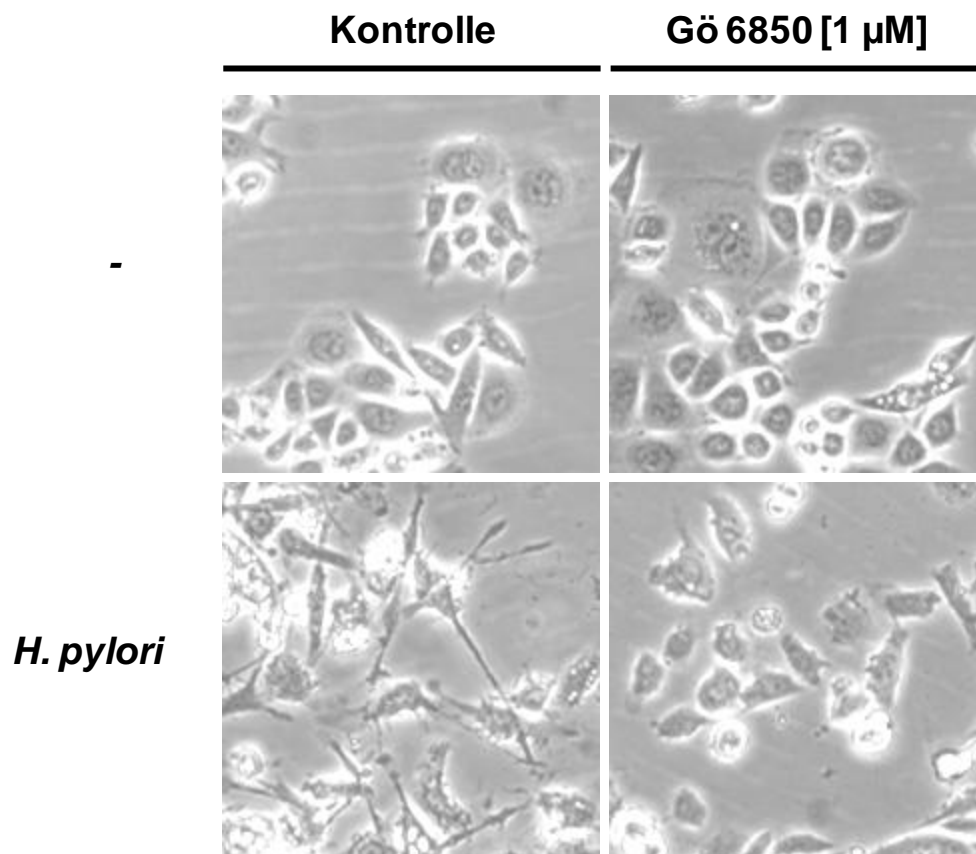


**Abbildung 5.9: Western Blot Analyse pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfizierter AGS Zellen vor und nach Stimulierung mit PMA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder *H. pylori* mit und ohne Inhibierung von PKC durch Gö6850:** Nachweis der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung anhand eines anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers. Das c-Abl-Protein wurde mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH über einen anti-GAPDH Antikörper dargestellt.

Betrachtete man die Akkumulierung von c-Abl in diesen vier Ansätzen, so war auch hier eine leichte Intensivierung des Signals in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulierten AGS Zellen bei gleich bleibendem Gesamtproteingehalt (GAPDH) zu erkennen (Abb. 5.9, Spur 1–4, c-Abl, GAPDH). Unter Verwendung von Gö6850 wurde die *H. pylori*-induzierte c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung auf das Niveau der kontrollinfizierten AGS Zellen minimiert (Abb. 5.9, Spur 5 und 6, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Auch die PMA-induzierte Phosphorylierung wurde durch Einsatz des Inhibitors im Vergleich zu den Inhibitor-unbehandelten Zellen reduziert (Abb. 5.9, Spur 4 und 8, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Während die Inhibierung von PKC sowohl in den *H. pylori*-infizierten als auch in den PMA-stimulierten Zellen zu einem Rückgang der Phosphorylierung führte, blieb dieser Effekt in den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierten AGS Zellen aus (Abb. 5.9, Spur 3 und 7, p-c-Abl<sup>T735</sup>). In den mit Inhibitor-behandelten Zellen konnte eine generelle Erhöhung des c-Abl Gehalts dokumentiert werden (Abb. 5. 9, Spur 5-8, c-Abl).

Die phasenkontrastmikroskopische Dokumentation pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierender AGS Zellen mit und ohne einstündige Präinkubation von Gö6850 und anschließender sechsständiger *H. pylori*-Infektion zeigte deutliche Unterschiede in der Elongation der infizierten Zellen (Abb.

5.10). Vor Infektion wiesen die AGS Zellen aus beiden Versuchsansätzen einen ähnlichen Phänotyp mit intakten Zell-Zell-Verbindungen und einer rundlichen Zellmorphologie auf (Abb. 5.10, Kontrolle und Gö6850 oben). Nach Infektion der nicht behandelten Kontrollzellen führte dies zur Elongation und Motilität der infizierten Zellen (Abb. 5.10, Kontrolle *H. pylori* links unten). Die Gö6850-behandelten Zellen hingegen verloren zwar ihre Zell-Zell-Kontakte, jedoch blieb die Elongation der Zellen völlig aus (Abb. 5. 12, Gö6850 *H. pylori* rechts unten). Auch das erhöhte Maß an Motilität der infizierten Zellen konnte nicht in einer solchen Intensität beobachtet werden. Während die *H. pylori*-Infektion der Inhibitor-unbehandelten AGS Zellen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Zellkulturschale bewirkte, wiesen die Gö6850-behandelten Zellen ein geringeres Maß an vereinzelt Zellen nach Infektion auf.



**Abbildung 5.10:** Phasenkontrastmikroskopie von pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten AGS Zellen mit (rechts) und ohne (links) einstündiger Präinkubation mit Gö6850 und anschließender *H. pylori* (unten) oder Kontrollstimulation (oben); 40- fache Vergrößerung.

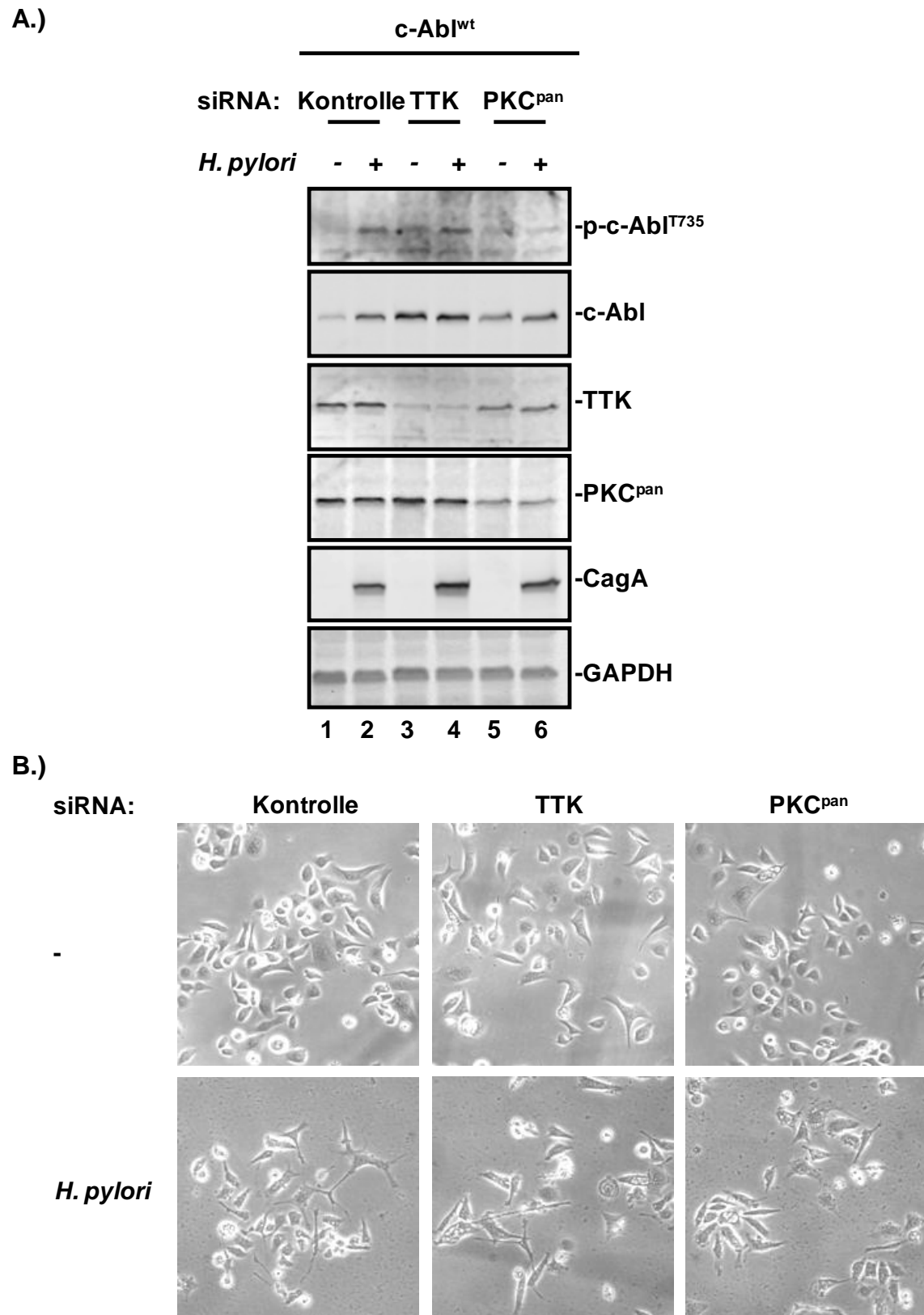
Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass nach Inhibierung von PKC eine reduzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in *H. pylori*- und PMA-stimulierten Zellen erfolgt. Im Gegensatz dazu zeigte der Einsatz des PKC-Inhibitors Gö6850 keinen merklichen Einfluss auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>. Neben der Inhibierung der Phosphorylierung zeigte

sich zudem ein Ausbleiben der Elongation und Motilität in den mit Gö6850-behandelten Zellen nach *H. pylori*-Infektion.

Die Ergebnisse der Versuche der Koexpression und des Einsatzes des PKC-Inhibitors Gö6850 zeigten sowohl einen Einfluss von TTK als auch PKC auf die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>. Aufgrund dessen wurde in einem weiterführenden Experiment der Einfluss von TTK und PKC auf die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> während einer sechsständigen *H. pylori*-Infektion direkt miteinander verglichen. Die Expression von TTK und PKC wurde unter Verwendung von siRNA unterbunden (*knock down*) und die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen in einem Western Blot dokumentiert (Abb. 5.11.A). Neben dem Einsatz einer siRNA gegen TTK und einer pan-spezifischen siRNA gegen PKC (PKC<sup>pan</sup>) wurde eine 20-25nt große *non-targeting* Kontroll-siRNA verwendet (Abb. 5.11.A). Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, wiesen eine Induktion der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion (MOI 100) auf (Abb. 5.11.A, Spur 1-2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Der Gehalt an TTK oder PKC in diesen Zellen wurde durch den Einsatz der Kontroll-siRNA im Vergleich zu der TTK- oder PKC-spezifischen siRNA nicht vermindert (Abb. 5.11.A, Spur 1-2, TTK, PKC). Nach sechsständiger *H. pylori*-Infektion der Kontroll-siRNA-behandelten AGS Zellen wurde ein erhöhtes Maß an c-Abl in diesen Zellen bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge an GAPDH im Western Blot dokumentiert (Abb. 5.11.A, Spur 1-2, c-Abl, GAPDH). Die Behandlung der AGS Zellen mit TTK-siRNA resultierte in einer Verminderung des TTK-Proteins jedoch nicht in einer Verminderung der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion (Abb. 5.11.A, Spur 3-4, TTK, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die Inkubation der Zellen mit der PKC-siRNA führte zu einer Reduktion des PKC-Gehaltes der Zellen und zudem in einem Ausbleiben der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion (Abb. 5.11.A, Spur 5-6, PKC<sup>pan</sup>, p-c-Abl<sup>T735</sup>; Abb. 5. 11.A, Spur 1-6, TTK und PKC<sup>pan</sup>). In diesem Experiment wurde neben dem Einfluss auf die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> sechs Stunden nach *H. pylori* Infektion ein Effekt der TTK- und PKC-siRNA auf den Gesamtproteingehalt von c-Abl bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge an GAPDH in den infizierten Zellen dokumentiert. Eine Inkubation der AGS Zellen mit TTK- und PKC-siRNA führte in beiden Fällen zu einem gleichmäßigen c-Abl-Gehalt in kontroll- und *H. pylori*-infizierten Zellen. Die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen wiesen nach *H. pylori*-Infektion ein vermehrtes Maß an c-Abl bei gleichbleibendem Gesamtprotein GAPDH auf (Abb. 5.11.A, Spur 1-6, c-Abl, GAPDH). Die Behandlung der AGS Zellen mit TTK-siRNA führte zudem zu einer generellen Erhöhung der Gesamtmenge an c-Abl im Vergleich zu den mit Kontroll- oder PKC-siRNA behandelten Zellen. Eine Dokumentation dieses Versuches mit einem Phasenkontrastmikroskop zeigte Unterschiede im Zellverhalten der kontroll- und *H. pylori*-infizierten AGS Zellen (Abb. 5.11.B). Die kontrollinfizierten Zellen der mit Kontroll-siRNA-

oder mit PKC-siRNA behandelten Zellen wiesen einen weitgehend intakten Zell-Zell-Verband und eine enge räumliche Nähe zueinander auf. Die kontrollinfizierten Zellen der TTK-siRNA-behandelten Zellen waren über die gesamte Zellkulturschale verteilt und vereinzelt. Die räumliche Nähe der Zellen zueinander war größer als die der mit Kontroll-siRNA- oder PKC-siRNA behandelten Zellen (Abb. 5.11.B, -, oben). Sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion wiesen ca. 50% der adhärennten Zellen der Kontroll-siRNA Elongationen auf. Die Infektion der TTK-siRNA-behandelten AGS Zellen führte sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion zu einer Elongation der adhärennten Zellen von ca. 40%. Eine sechsstündige *H. pylori*-Infektion der PKC-siRNA-behandelten AGS Zellen resultierte in einer Elongation von ca. 10% der adhärennten Zellen (Abb. 5.11.B, *H. pylori*, unten). Eine Infektion der Kontroll-siRNA-behandelten AGS Zellen führte zu einer Auflockerung des Zellverbands durch Auseinanderweichen der Zellen. Dies blieb bei den PKC-siRNA-behandelten Zellen weitgehend aus. Die TTK-siRNA-behandelten Zellen wiesen bereits in den kontrollinfizierten Zellen einen lockeren Zellverband auf. Ein weiteres Auseinanderweichen dieser Zellen nach *H. pylori*-Infektion wurde nicht beobachtet.

Durch den Einsatz von spezifischer siRNA konnte gezeigt werden, dass der *knock down* von PKC eine Reduktion der *H. pylori*-induzierten Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> sechs Stunden nach Infektion hervorrief. Diese Reduktion der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> konnte durch Einsatz von TTK-siRNA nicht im gleichen Maße erzielt werden. Desweiteren wiesen sowohl TTK- als auch PKC-siRNA-behandelte Zellen eine verminderte Elongation auf. Diese betrug nach PKC *knock down* 10% im Gegensatz zu dem TTK *knock down* mit 40% elongierten Zellen sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion. Zudem blieb eine Vereinzelnung der PKC-siRNA-behandelten Zellen sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion weitgehend aus. Die TTK-siRNA-behandelten AGS Zellen wiesen im Gegensatz zu den mit PKC- und mit Kontroll-siRNA behandelten AGS Zellen generell einen gesteigerten c-Abl-Gesamtproteingehalt und eine gesteigerte Zellmotilität auf.

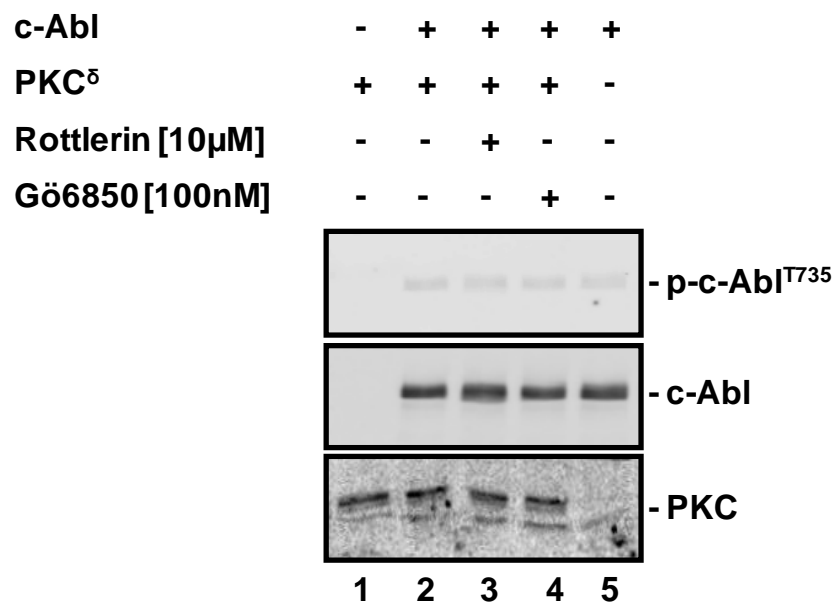


**Abbildung 5.11: Western Blot Analyse pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter AGS Zellen nach Inkubation mit TTK-, PKC<sup>pan</sup> oder kontrolspezifischer siRNA und anschließender Kontroll- oder *H. pylori*-Infektion: A.)** Der Nachweis von p-c-Abl<sup>T735</sup> erfolgte über anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper, c-Abl mit anti-c-Abl- (24-11), TTK mit anti-TTK und PKC mit anti-PKC<sup>pan</sup>-Antikörper. Als Nachweis der *H. pylori*-Infektion diente ein anti-CagA Antikörper. GAPDH erfolgte über anti-GAPDH Antikörper. **B.)** Der Phänotyp der mit Kontroll-, TTK- oder PKC<sup>pan</sup>-siRNA behandelten AGS Zellen erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskop bei 10-facher Vergrößerung.

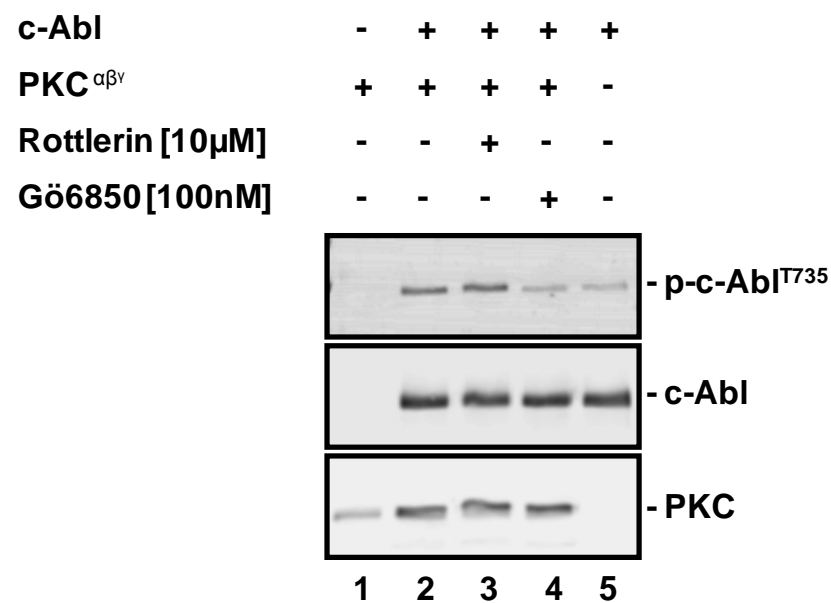
### 5.2.2 PKC $\alpha$ und PKC $\delta$ phosphorylieren c-Abl an Threonin<sup>735</sup> *in vitro*

Ein solcher Effekt von PKC auf den Phänotyp *H. pylori*-infizierter AGS Zellen wurde durch den Einsatz von PKC-spezifischen Inhibitoren 2009 von Brandt *et al.* beschrieben. Hierbei stellte sich heraus, dass die Aktivierung der PKC Isoformen  $\alpha$  und besonders  $\delta$  für die Ausbildung des *Scatter* Phänotyps und die Elongation der infizierten Zellen eine Rolle spielen. Aus diesem Grunde lag die Vermutung nahe, dass eine der beiden PKC Isoformen im Laufe einer *H. pylori*-Infektion c-Abl an Threonin<sup>735</sup> phosphoryliert. In einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit gereinigten Kinasen und Substraten wurde die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch PKC überprüft. Zu diesem Zweck wurde aktiviertes PKC $\delta$  oder eine Mischung aus aktiviertem PKC $\alpha\beta\gamma$  mit gereinigtem c-Abl Protein als Substrat in einer *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt (Abb. 5.12.A und B). In beiden *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen wurde die Spezifität der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch den Einsatz eines spezifischen Inhibitors gegen PKC $\delta$  (Rottlerin) und eines panspezifischen Inhibitors gegen PKC $\alpha\beta\gamma$  (Gö6850) bestimmt. Abb. 5.12.A zeigt zunächst die *in vitro* Phosphorylierung von c-Abl mit PKC $\delta$ . PKC $\delta$  alleine bewirkte kein Signal in der Größe von p-c-Abl<sup>T735</sup> in dem Phosphorylierungsansatz (Abb. 5.12. A, Spur 1, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Nach Inkubation von c-Abl mit PKC $\delta$  wurde ein leichtes basales p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signal an c-Abl detektiert (Abb. 5. 12. A, Spur 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Diese basale Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> wurde in jeder der vier *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen detektiert, in die c-Abl hinzugefügt wurde. Eine Inkubation von c-Abl in dem *in vitro* Reaktionspuffer ohne PKC $\delta$  wies auch diese basale Phosphorylierung auf, so dass man davon ausgehen kann, dass bereits das aufgereinigte c-Abl eine basale Phosphorylierung an Threonin<sup>735</sup> beinhaltet. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine geringe Unspezifität des p-c-Abl<sup>T735</sup>-Antikörpers. Der Nachweis von PKC $\delta$  und c-Abl in den entsprechenden Reaktionsansätzen wurde durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen c-Abl und einen panspezifischen Antikörper gegen PKC im Western Blot bestätigt (Abb. 5.12.A, Spur 1-4, c-Abl, PKC). In der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion von c-Abl mit PKC $\delta$  wurde demnach zu keiner Zeit eine spezifische Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch PKC $\delta$  beobachtet. In einer weiteren *in vitro* Phosphorylierungsreaktion wurde gereinigtes c-Abl mit einer Mischung aus aktiviertem PKC $\alpha\beta\gamma$  inkubiert (Abb. 5. 12. B). Auch hier war eine basale Phosphorylierung an c-Abl ohne die Zugabe von PKC $\alpha\beta\gamma$  zu erkennen (Abb. 5.12.B, Spur 5, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Diese wurde jedoch nach einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit PKC $\alpha\beta\gamma$  deutlich verstärkt (Abb. 5.12.B, Spur 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Zudem wurde die induzierte Phosphorylierung durch eine zehnminütige Präinkubation der Kinase mit dem PKC-Inhibitor Gö6850 auf den basalen Wert reduziert (Abb. 5.12.B, Spur 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>).

A.)



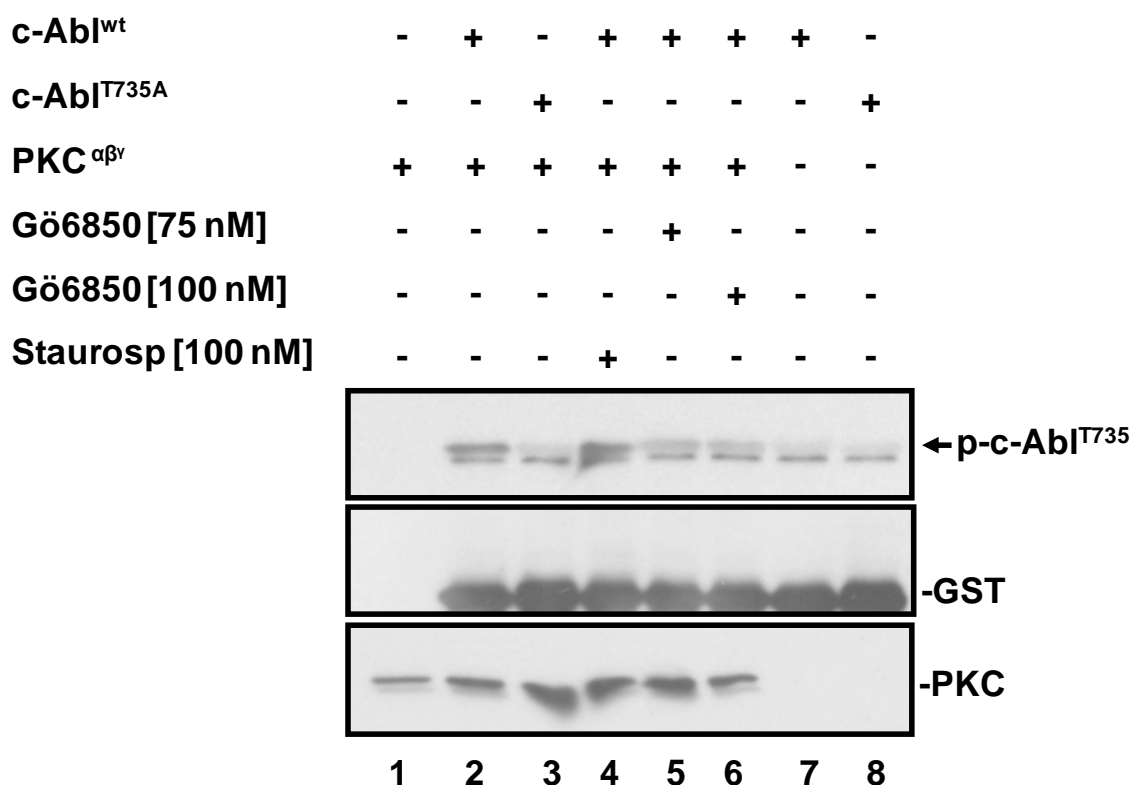
B.)



**Abbildung 5. 12: Western Blot Analyse der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion von c-Abl und PKC:** C-Abl<sup>T735</sup> wurde in einem *in vitro* Phosphorylierungsexperiment mit **A.)** aktiviertem PKC<sup>δ</sup> oder **B.)** aktiviertem PKC<sup>αβγ</sup> inkubiert und die Reaktion im Western Blot analysiert. PKC wurde allein (Spur 1) und in Anwesenheit von c-Abl (Spur 2-5) zugegeben. Vor Initiierung der Reaktion wurde in beide Ansätze Rottlerin 10 μM (Spur 3) oder Gö6850 100 nM (Spur 4) zugegeben. Die c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung wurde mit einem anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für PKC wurde ein anti-PKC<sup>pan</sup> Antikörper verwendet.

Eine Behandlung mit dem PKC $^{\delta}$  Inhibitor Rottlerin hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsreaktion an c-Abl $^{T735}$  (Abb. 5.12.B, Spur 3, p-c-Abl $^{T735}$ ). Der Nachweis von PKC $^{\alpha\beta\gamma}$  und c-Abl in den entsprechenden Reaktionsansätzen wurde durch den Einsatz eines spezifischen Antikörpern gegen c-Abl und eines panspezifischen Antikörpers gegen PKC im Western Blot bestätigt (Abb. 5.12.B, Spur 1-4, c-Abl, PKC). Das Ergebnis der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion von c-Abl mit PKC $^{\alpha\beta\gamma}$  lässt auf eine Phosphorylierung von c-Abl an Threonin $^{735}$  durch PKC $^{\alpha\beta\gamma}$  schliessen.

In einer letzten *in vitro* Phosphorylierungsreaktion wurde die Phosphorylierung an c-Abl $^{T735}$  durch PKC $^{\alpha\beta\gamma}$  an zwei aufgereinigten GST-markierten c-Abl-Proteinfragmenten gezeigt (Abb. 5.13).



**Abbildung 5. 13: Western Blot Analyse der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion von GST-c-Abl<sup>wt</sup> und GST-c-Abl<sup>T735A</sup> mit PKC $^{\alpha\beta\gamma}$ :** In einem *in vitro* Phosphorylierungsexperiment wurde die Phosphorylierung an GST-c-Abl-Protein-Fragmenten mit aktiviertem PKC $^{\alpha\beta\gamma}$  durchgeführt und die Reaktion im Western Blot analysiert. PKC wurde allein (Spur 1) und in Anwesenheit von GST-c-Abl<sup>wt 668-774</sup> (Spur 2, 4-6) oder GST-c-Abl<sup>T735A 668-774</sup> (Spur 3) zugegeben. Vor Initiierung der Reaktion wurde in drei Ansätze entweder Staurosporin 100 nM (Spur 4), Gö6850 75 nM (Spur 3) oder Gö6850 100 nM (Spur 3) zugegeben. Zudem wurden die Fragmente ohne aktivierte PKC $^{\alpha\beta\gamma}$  in zwei Reaktionen mitgeführt (Spur 7 und 8). Nach Beendigung der Reaktion wurde die c-Abl $^{T735}$  Phosphorylierung wurde mit einem anti p-c-Abl $^{T735}$  und die GST-c-Abl-Fusionsproteine mittels anti-GST Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für PKC wurde ein anti-PKC<sup>pan</sup> Antikörper verwendet.

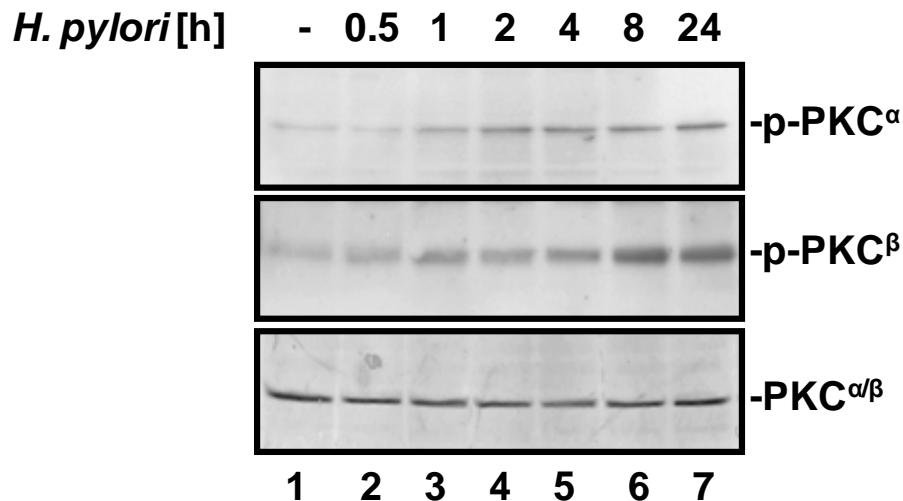


Die Fragmente bestanden aus einer Fusion von GST am N-Terminus und den Aminosäuren 668-774 von c-Abl<sup>wt</sup> (c-Abl<sup>wt</sup> 668-774) oder c-Abl<sup>T735A</sup> (c-Abl<sup>T735A</sup> 668-774) am C-terminalen Ende. Die beiden 36kDa großen Proteine wurden in *E. coli* produziert und aufgereinigt. Vorab ist zu sagen, dass sowohl bei c-Abl<sup>wt</sup> 668-774 als auch c-Abl<sup>T735A</sup> 668-774 eine unspezifische Bande während der Detektion mit dem p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper beobachtet wurde (Abb. 5.13). Hierbei handelte es sich um die untere der beiden Banden. Eine solche doppelte Bande wurde auch nach Auftragung der c-Abl-Protein-Fragmente auf ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel nach der Aufreinigung aus *E. coli* beobachtet. Das eigentliche p-c-Abl<sup>T735</sup> Signal wurde mit einem Pfeil markiert.

Das c-Abl<sup>wt</sup> 668-774-Protein wies ohne aktiviertes PKC<sup>αβγ</sup> keine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf. Eine Inkubation des c-Abl<sup>wt</sup> 668-774-Proteins mit PKC<sup>αβγ</sup> in der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion resultierte in einer Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (Abb. 5.13, Spur 2 und 7, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Im Gegensatz dazu wies das c-Abl<sup>T735A</sup> 668-774 Protein weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von PKC<sup>αβγ</sup> eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf (Abb. 5.13, Spur 3 und 8, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Inhibition von PKC<sup>αβγ</sup> während der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit Gö6850 [75 nM] oder [100 nM] resultierte in einer Reduktion des p-c-Abl<sup>T735</sup> Signals (Abb. 5.13, Spur 5 und 6, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die Intensität der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch PKC<sup>αβγ</sup> wurde nicht durch die Zugabe des Inhibitor Staurosporin abgeschwächt (Abb. 5. 13, Spur 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Staurosporin ist ein Inhibitor mit einem großen Wirkspektrum und inhibiert unter anderem Proteinkinasen A, -C, -G und -CAM. Auch die Ergebnisse dieser dritten *in vitro* Phosphorylierungsreaktion deuten auf eine spezifische Phosphorylierung von c-Abl an Threonin<sup>735</sup> durch aktiviertes PKC<sup>αβγ</sup> hin.

Eine spezifische Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> an aufgereinigtem c-Abl durch aktiviertes PKC<sup>αβγ</sup> konnte in einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion gezeigt werden. Um Rückschlüsse von dieser *in vitro* Phosphorylierung auf eine *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch die PKC Isoformen α, β und γ schliessen zu können, wurde eine Aktivierung dieser PKC Isoformen in AGS Zellen während einer *H. pylori*-Infektion untersucht. PKC<sup>γ</sup> kommt ausschließlich in Zellen des neuronalen Nervensystems vor (Abeliovich *et al.*, 1993). Aus diesem Grunde war eine *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch PKC<sup>γ</sup> in AGS Zellen auszuschließen. Die Nachweis der Aktivierung von PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> erfolgte in einer 24-stündigen *H. pylori*-Infektionskinetik (MOI 100) von AGS Zellen mit anschließender Analyse im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> (Abb. 5.14). Vor Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori* wiesen die Zellen eine basale Phosphorylierung sowohl an PKC<sup>α</sup> als auch an PKC<sup>β</sup> auf (Abb. 5.14, Spur 1-7, p-PKC<sup>α</sup>, p-PKC<sup>β</sup>). Mit steigender Infektionsdauer intensivierte sich das Signal der Phosphorylierung bis

zu 24 Stunden nach Infektion sowohl an  $\text{PKC}^\alpha$  als auch  $\text{PKC}^\beta$  bei gleichbleibendem Gehalt an  $\text{PKC}^\alpha$  und  $\text{PKC}^\beta$  in den infizierten Zellen (Abb. 5.14, Spur 1-7, p- $\text{PKC}^\alpha$ , p- $\text{PKC}^\beta$ ,  $\text{PKC}^{\alpha/\beta}$ ).



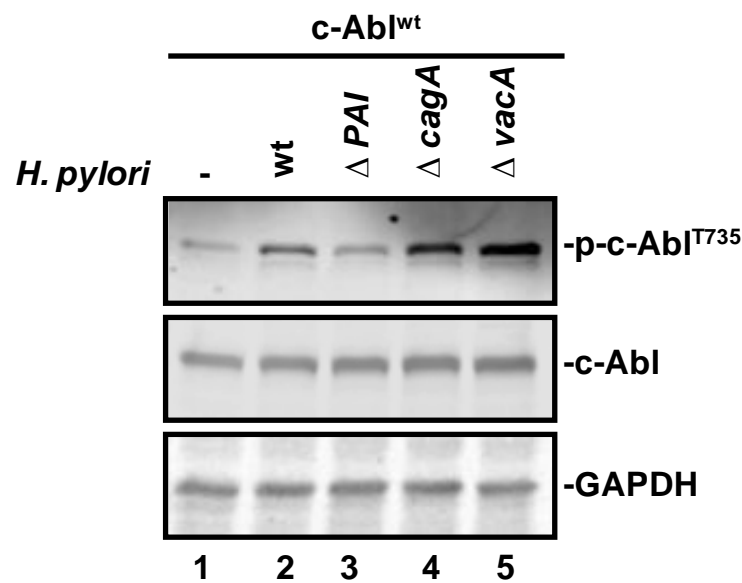
**Abbildung 5. 14: Western Blot Analyse von AGS Zellen während einer 24-stündigen *H. pylori*-Infektion:** AGS Zellen wurden nicht (Spur 1) oder mit *H. pylori* (Spur 2-7) MOI 100 für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Im Anschluss wurde die Aktivierung von  $\text{PKC}^\alpha$  und  $\text{PKC}^\beta$  im Western Blot mit einem spezifischen anti-p- $\text{PKC}^\alpha$  und anti-p- $\text{PKC}^\beta$  Antikörper detektiert. Der Nachweis von nicht phosphoryliertem  $\text{PKC}^\alpha$  und  $\text{PKC}^\beta$  erfolgte mit einem anti-  $\text{PKC}^{\alpha/\beta}$  Antikörper.

Zusammenfassend konnte anhand der *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen gezeigt werden, dass  $\text{PKC}^{\alpha/\beta}$  c-Abl an Threonin<sup>735</sup> phosphorylieren. Zudem unterstreicht der Nachweis der Aktivierung von  $\text{PKC}^\alpha$  und  $\text{PKC}^\beta$  im Laufe einer 24-stündigen *H. pylori*-Infektion die Vermutung, dass es sich bei der gesuchten Threoninkinase um  $\text{PKC}^\alpha$  und/oder  $\text{PKC}^\beta$  handelt.

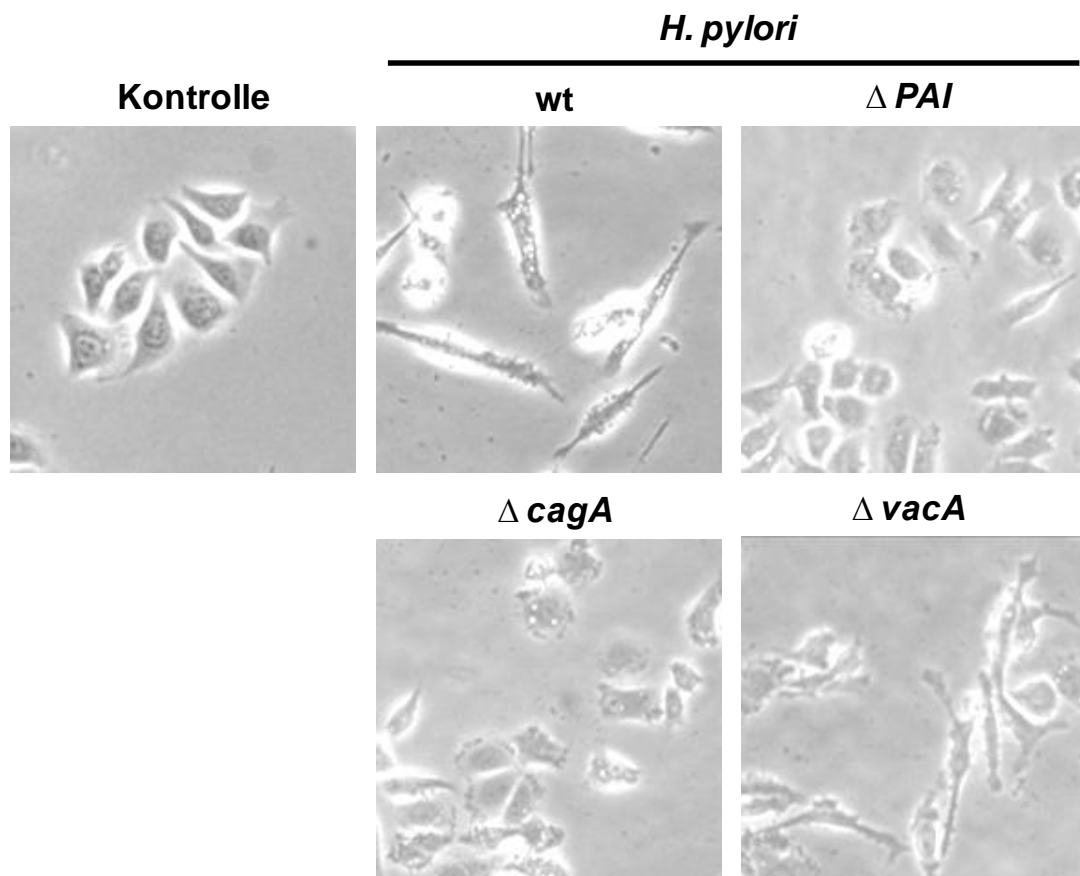
### 5.3 Die *H. pylori*-induzierte c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung wird durch bakterielles CagL des T4SS vermittelt.

Neben der Suche nach der zellulären Threoninkinase stellte sich die Frage nach dem bakteriellen Faktor, durch den die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in den *H. pylori*-infizierten Zellen induziert wurde. In einer Vorarbeit in MCF-7 Zellen wurde bereits gezeigt, dass die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> unabhängig von dem Pathogenitätsfaktor CagA war, jedoch eine intakte *cagPAI* mit einem funktionellen T4SS bedurfte (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Zu diesem Zeitpunkt konnte keine Aussage über den Einfluss des Pathogenitätsfaktors VacA auf eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> gemacht werden. Aus diesem Grunde wurde in AGS Zellen der Einfluß von *cagPAI*, CagA und VacA erneut überprüft. AGS Zellen wurden mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert, mit *H. pylori* Wildtyp (*H. pylori*<sup>wt</sup>) oder den isogenen *H. pylori* Mutanten  $\Delta$  *PAI*,  $\Delta$  *cagA* und  $\Delta$  *vacA* für sechs Stunden infiziert und die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> per Western Blot überprüft (Abb. 5.15). Eine Infektion mit *H. pylori*<sup>wt</sup>-induzierte im Vergleich zu den kontrollinfizierten Zellen eine moderate Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (Abb. 5.15.A, Spur 1 und 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Infektion der AGS Zellen mit  $\Delta$  *PAI* glich dem Niveau der Phosphorylierung der kontrollinfizierten AGS Zellen (Abb. 5.15.A, Spur 1 und 3, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Verglich man die Induktion der Phosphorylierung der  $\Delta$  *cagA*- und  $\Delta$  *vacA*-infizierten Zellen mit den *H. pylori*<sup>wt</sup>-infizierten Zellen, so induzierten  $\Delta$  *cagA* und  $\Delta$  *vacA* eine stärkere Phosphorylierung als der *H. pylori*<sup>wt</sup> (Abb. 5.15.A, Spur 2, 4 und 5, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Der Gehalt an c-Abl und GAPDH in allen fünf Ansätzen wies ein ähnliches Niveau auf (Abb. 5.15.A, Spur 1 - 5, c-Abl, GAPDH). Die Infektion der AGS Zellen wurde mit einem Inversmikroskop dokumentiert (Abb. 5.15.B). Eine Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori*<sup>wt</sup> führte zu einer charakteristischen Elongation der Zellen, einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte, einer erhöhten Motilität und Vakuolen Bildung (Abb. 5.15.B, wt oben Mitte). Eine Infektion mit  $\Delta$  *PAI* und  $\Delta$  *cagA* führte zu einem verminderten Zell-Zell-Kontakt und einer erhöhten Zahl an Vakuolen (Abb. 5.15.B,  $\Delta$  *PAI* oben rechts und  $\Delta$  *cagA* unten links). Eine Elongation der infizierten Zellen wurde nicht dokumentiert. Die Infektion der AGS Zellen mit  $\Delta$  *vacA* ähnelte dem Phänotyp der *H. pylori*<sup>wt</sup>-infizierten Zellen, jedoch ohne das Auftreten von Vakuolen (Abb. 5.15.A,  $\Delta$  *vacA* unten rechts).

A.)



B.)

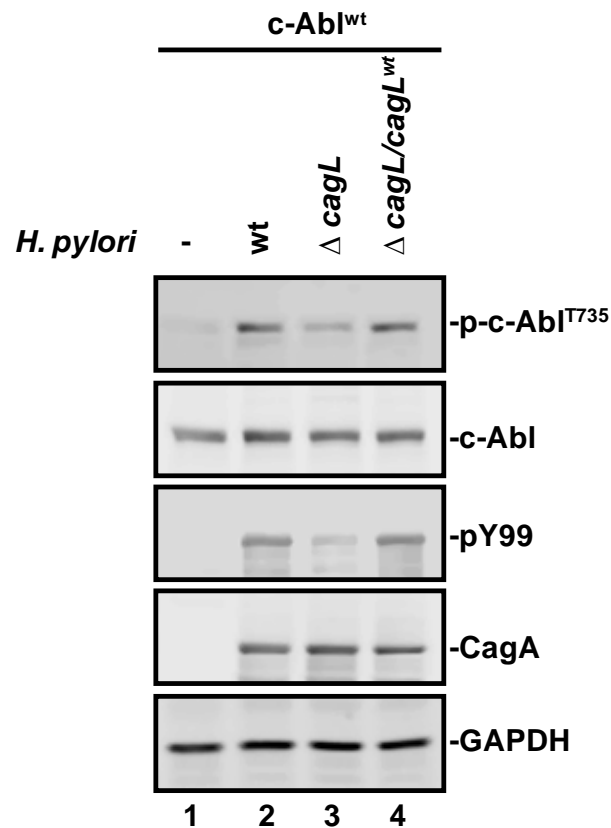


**Abbildung 5.15: Western Blot Analyse pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter AGS Zellen nach sechsstündiger Infektion mit *H. pylori*<sup>wt</sup> und den isogenen *H. pylori*-Mutanten  $\Delta$  PAI,  $\Delta$  cagA und  $\Delta$  vacA : A.)** pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfizierte AGS Zellen wurden schein- (Spur 1), mit *H. pylori*<sup>wt</sup> (Spur 2) oder den *H. pylori* isogenen Mutanten  $\Delta$  PAI (Spur 3),  $\Delta$  cagA (Spur 4) und  $\Delta$  vacA (Spur 5) mit MOI 100 für 6 Stunden infiziert und die Induktion von p-c-Abl<sup>T735</sup> im Western Blot detektiert. Der Nachweis von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl Antikörper (24-11) und GAPDH diente als Ladekontrolle. **B.)** Die phänotypische Veränderung dieser Zellen wurde mittels eines Phasenkontrastmikroskops bei 40-facher Vergrößerung dokumentiert.

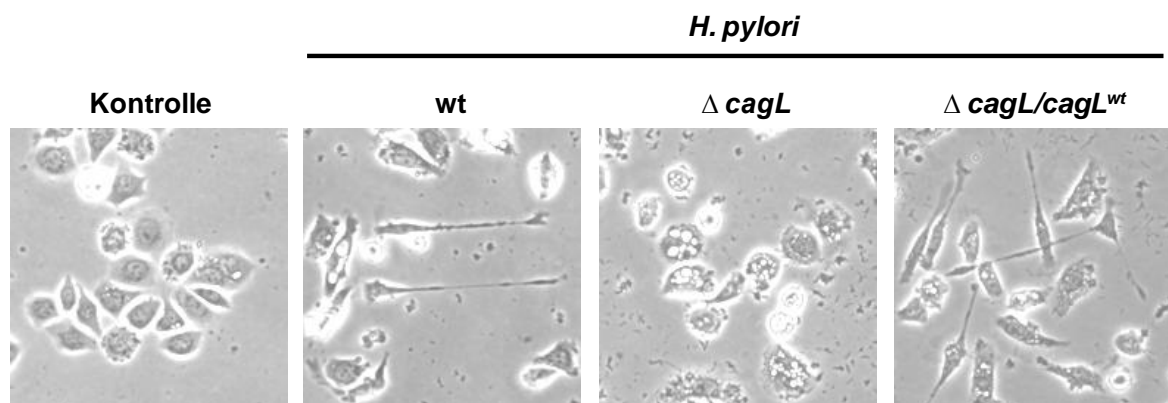
Nachdem in AGS Zellen ein positiver Einfluss einer intakten *cagPAI* von *H. pylori* auf die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> gezeigt werden konnte, wurde die Abhängigkeit der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung von einem funktionellen T4SS eruiert. Aus MCF-7 Zellen war bereits bekannt, dass ein nicht funktionsfähiges T4SS zu einem Ausbleiben der c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung während einer *H. pylori*-Infektion führt (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). 2007 wurde in *H. pylori* der bakterieller Faktor CagL identifiziert, der an der Spitze des T4SS lokalisiert ist. Dieses Adhäsın interagiert während einer Infektion mit Integrinen der Zelloberfläche infizierter Zellen und ermöglicht somit das Auslösen einer Reihe von Signalkaskaden in den Wirtszellen (Kwok *et al.*, 2007). Dies gab Grund zu der Annahme, dass die Induktion der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> einer Rezeptorstimulation an den infizierten Zellen durch *H. pylori* bedurfte. Um dies zu überprüfen, wurden AGS Zellen mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert, mit *H. pylori*<sup>wt</sup> oder den isogenen Mutanen  $\Delta$  *cagL* und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> (rekonstituierte *H.pylori*  $\Delta$  *cagL*-Mutante) für sechs Stunden infiziert und die Phosphorylierung mittels Western Blot analysiert (Abb. 5.16). Neben der Induktion der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> wurde diesmal zusätzlich die Induktion der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen in der Größe des bakteriellen Faktors CagA mit einem Phosphotyrosinantikörper (pY99) dokumentiert (Schneider *et al.*, 2011). Eine Infektion mit *H. pylori*<sup>wt</sup> bewirkte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (Abb. 5.16.A, Spur 1 und 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Infektion der AGS Zellen mit der *H. pylori*  $\Delta$  *cagL*-Mutante wies eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf, die etwas über der der kontrollinfizierten AGS Zellen lag (Abb. 5.16.A, Spur 3, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Infektion der Zellen mit der rekompilierten  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup>-Mutante glich der Intensität der durch *H. pylori*<sup>wt</sup> hervorgerufenen Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (Abb. 5.16.A, Spur 2 und 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori* führte in allen drei Ansätzen zu einer Akkumulation von c-Abl bei gleich bleibendem GAPDH-Gehalt (Abb. 5.16.A, Spur 2 - 4, c-Abl, GAPDH). Bezüglich der *H. pylori*-induzierten Tyrosinphosphorylierung in den vier Ansätzen wurde sowohl in den Kontrollzellen als auch den  $\Delta$  *cagL*-infizierten Zellen eine wesentlich niedrigere Tyrosinphosphorylierung detektiert (Abb. 5.16.A, Spur 1 und 3, pY99). Ein Nachweis von CagA erfolgte in allen drei Infektionsansätzen mittels eines spezifischen anti-CagA Antikörpers (Abb. 5.16.A, Spur 2 – 4, CagA). Diese CagL-vermittelte Induktion der Tyrosinphosphorylierung in den infizierten Zellen und die daraus resultierende Tyrosinphosphorylierung des bakteriellen CagA im Zytoplasma der Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Kwok *et al.*, 2007). Die Dokumentation der Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori*<sup>wt</sup>,  $\Delta$  *cagL* und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> mit einem Inversmikroskop zeigte Unterschiede in der phänotypischen Veränderung der infizierten Zellen (Abb. 5.16.B). Eine Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori*<sup>wt</sup> und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> resultierte in einer erhöhten

Elongation und Motilität, Vakuolen-Bildung und verminderte Zell-Zell-Kontakte der infizierten Zellen (Abb. 5. 16. B, *H. pylori*<sup>wt</sup> und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup>).

A.)



B.)



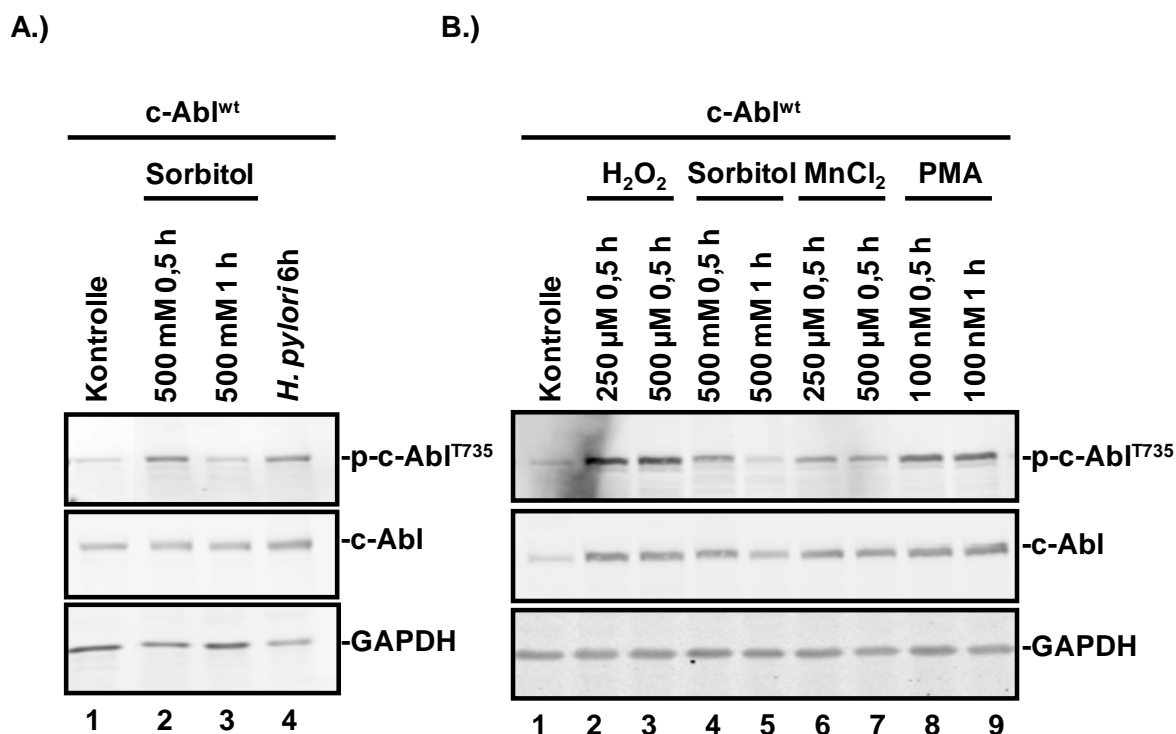
**Abbildung 5.16: Western Blot Analyse pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter AGS Zellen nach sechsstündiger Infektion mit *H. pylori*<sup>wt</sup> und den isogenen *H. pylori*-Mutanten  $\Delta$  *cagL* und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> :** pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfizierte AGS Zellen wurden schein- (Spur 1), mit *H. pylori*<sup>wt</sup> (wt, Spur 2) oder den *H. pylori* isogenen Mutanten  $\Delta$  *cagL* (Spur 3) und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> (Spur 4) mit MOI 100 für 6 Stunden infiziert und die Induktion von p-c-Abl<sup>T735</sup> im Western Blot detektiert. Der Nachweis von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl Antikörper (24-11). Neben der zellulären Ladekontrolle GAPDH wurde zudem bakterielles CagA mit einem anti-CagA und dessen Tyrosinphosphorylierung mit einem anti-pY99 Antikörper detektiert. **B.)** Die phänotypische Veränderung dieser Zellen wurde mittels eines Phasenkontrastmikroskops bei 40-facher Vergrößerung dokumentiert.

AGS Zellen, die mit  $\Delta$  *cagL* infiziert wurden, wiesen eine stärkere Vakuolen-Bildung und verminderte Zell-Zell-Kontakte auf. Eine erhöhte Elongation und Motilität wurde in diesen Zellen nicht beobachtet (Abb. 5.16.B, Kontrolle und  $\Delta$  *cagL*).

Durch den Einsatz der verschiedenen isogenen *H. pylori*-Mutanten konnte ein positiver Einfluss einer intakten *H. pylori* *cagPAI* auf die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> gezeigt werden. Zudem bedurfte es des bakteriellen Faktors CagL des T4SS um eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in den *H. pylori*-infizierten AGS Zellen hervorzurufen.

In einem weiteren Experiment sollte gezeigt werden, inwieweit die Aktivierung von Integrinen der Zellen eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> vorantreibt (Abb. 5.17). Zu diesem Zweck wurde in AGS Zellen pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimiert und die Zellen mit Mangan(II)-chlorid (MnCl<sub>2</sub>) stimuliert, welches eine Stimulierung und anschließende Aktivierung von Integrinen bewirkt (Gailit und Ruoslahti, 1988). Neben MnCl<sub>2</sub> wurden die AGS Zellen mit *H. pylori*, PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat, auch TPA genannt), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Sorbitol stimuliert (Abb. 5.17). Sorbitol wurde als Stimulans hinzugenommen, da es als Positivkontrolle in dem Herstellerdatenblatt des p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers aufgeführt wurde. Im Verlauf dieser Arbeit wurde Sorbitol als Positivkontrolle durch die Verwendung von PMA als Positivkontrolle in dem Herstellerdatenblatt des p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers ersetzt ([www.scbt.com](http://www.scbt.com), 2012). Die Stimulierung von Zellen mit Sorbitol führt bei einer Konzentration von 500 mM zu einem massiven osmotischen Stress der Zellen und resultiert in der Aktivierung von zellulären Stresskaskaden, wie z. B. dem JNK (c-Jun N-terminale Kinase) MAP (Mitogen aktivierte Proteinkinase) Kinase Signalweg (Bagowski *et al.*, 2003). PSCT-Abl<sup>wt</sup>-transfizierte AGS Zellen wurden für eine halbe und eine Stunde mit 500 mM Sorbitol oder mit *H. pylori* für sechs Stunden stimuliert und die Intensität der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> mittels Western Blot angezeigt (Abb. 5.17.A, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Gemessen an den kontrollinfizierten AGS Zellen bewirkte eine Infektion mit *H. pylori* eine moderate Induktion des p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signals (Abb. 5.17.A, Spur 1 und 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Stimulierung mit Sorbitol 500 mM hingegen führte zu einem sehr heterogenen Ergebnis. Eine Stimulierung mit Sorbitol für eine halbe Stunde führte zu einer ähnlich starken Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> wie nach einer *H. pylori*-Infektion (Abb. 5.17.A, Spur 2 und 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Wurde die Dauer der Stimulierung mit Sorbitol jedoch bei gleichbleibender Konzentration auf eine Stunde erhöht, so war die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> vergleichbar mit dem Niveau der Phosphorylierung der kontrollinfizierten AGS Zellen (Abb. 5.17.A, Spur 1 und 3, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Verglich man die Stimulierung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sorbitol, MnCl<sub>2</sub> oder PMA miteinander, so wurde eine ähnlich starke Phosphorylierung durch Stimulierung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit 250 und 500 mM für eine halbe Stunde oder PMA mit 100 nM für eine halbe und eine Stunde induziert (Abb. 5.17.B, Spur 2, 3, 8 und 9, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die Behandlung der Zellen mit Sorbitol führte zu der

in Abb. 5.17.A beschriebenen Induktion der c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung nach einer halben Stunde (Abb. 5.17.B, Spur 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Im Vergleich zu der Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PMA fiel die Sorbitol-induzierte Phosphorylierung jedoch deutlich schwächer aus (Abb. 5. 17. B, Spur 2, 3, 4, 5, 8 und 9, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Behandlung der Zellen mit 250 nM Manganchlorid (MnCl<sub>2</sub>) für eine halbe Stunde glich in seiner Intensität der Phosphorylierung der halbstündigen Sorbitol Stimulierung (Abb. 5.17.B, Spur 4 und 6, p-c-Abl<sup>T735</sup>).



**Abbildung 5.17: Western Blot Analyse von pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten AGS Zellen nach Stimulierung mit *H. pylori*, Sorbitol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> und PMA:** **A)** AGS Zellen wurden mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert und mit Hilfe verschiedener Stimulanzien die c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung induziert. Hierzu wurden die Zellen scheininfiziert (Kontrolle Spur 1), mit Sorbitol 500 mM für 0,5 und 1 h (Spur 2 und 3) stimuliert oder mit *H. pylori* MOI 100 für 6 h infiziert (Spur 4). Nach dem Aufschluss der Zellen wurden 100 μg Protein per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Phosphorylierung von c-Abl<sup>T735</sup> mit einem spezifischen anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper detektiert. Der Nachweis von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl Antikörper (24-11). Als Ladekontrolle diente GAPDH. **B)** pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfizierte AGS Zellen wurden schein- (Kontrolle, Spur 1) oder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Spur 2 und 3), Sorbitol (Spur 4 und 5), MnCl<sub>2</sub> (Spur 6 und 7) und PMA (Spur 8 und 9) zu den oben genannten Konditionen stimuliert. P-c-Abl<sup>T735</sup>, c-Abl und GAPDH wurden mittels der in A.) erwähnten Antikörper detektiert.

Eine Erhöhung der Konzentration auf 500 nM MnCl<sub>2</sub> bei gleichbleibender Inkubationszeit bewirkte eine leichte Minderung der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> im Vergleich zu der Inkubierung mit 250 nM MnCl<sub>2</sub> (Abb. 5.17.B, Spur 6 und 7, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Eine Stimulierung der AGS Zellen mit den unterschiedlichen Substanzen führte bis auf die Stimulierung mit Sorbitol 500 mM zu einem Anstieg an c-Abl in den Zellen bei gleichbleibendem Gesamtproteingehalt



(GAPDH) (Abb. 5.17. B, Spur 1 - 9, c-Abl, GAPDH). Eine solche Akkumulierung von c-Abl nach Stimulierung wurde in Abb. 5.17.A nur in den *H. pylori* infizierten Zellen beobachtet (Abb. 5.17.A, Spur 4, c-Abl).

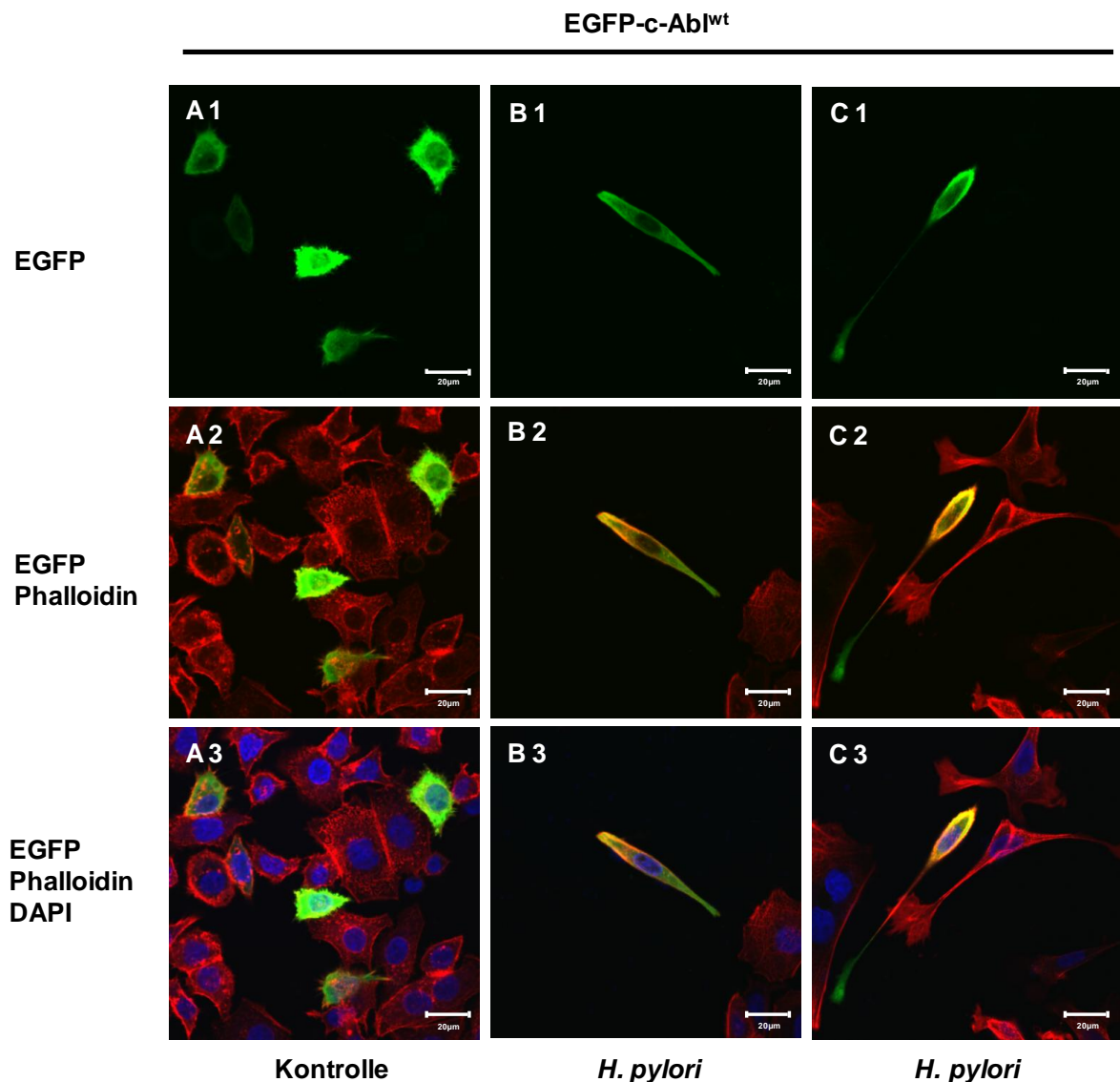
Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung von Integrinen mit  $\text{MnCl}_2$  eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> hervorruft. In seiner Intensität glich dieses der durch Sorbitol und *H. pylori*-induzierten Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>. Eine stärkere Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> wurde nach Stimulierung der Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und dem PKC Aktivator PMA induziert.

#### 5.4 Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> begünstigt die Lokalisierung

##### von c-Abl im Zytoplasma infizierter Zellen

2005 wurde von Yoshida *et al.* ein Einfluss der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf die Lokalisierung von c-Abl innerhalb der Zelle beschrieben. Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> begünstigt die Lokalisierung des Proteins im Zytoplasma. Geht mit der Threoninphosphorylierung eine Aktivierung von c-Abl einher, so treibt dies dessen Interaktion mit zytoplasmatischen Bindungspartnern voran und unterstützt somit die anti-apoptotische Wirkung von c-Abl in der Zelle (Yoshida *et al.*, 2005). Aus früheren Studien ist bekannt, dass endogenes c-Abl vor einer Infektion in gastralen Epithelzellen vorrangig im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach Infektion mit *H. pylori* konnte eine Lokalisierung von c-Abl in fokalen Kontaktstellen der Zellen (*focal adhesions*) ausgemacht werden (Poppe *et al.*, 2007). Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> Einfluss auf die Lokalisierung von c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion hat, wurden Immunfluoreszenzanalysen angefertigt (Abb. 5.18). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> (Abb. 5.18) oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> (Abb. 5.19) transfiziert und die Lokalisierung von c-Abl nach Infektion mit *H. pylori* oder Kontrollinfektion mittels Laser Scan Mikroskop (LSM) dokumentiert. Für eine bessere Lokalisierung der EGFP-markierten Proteine in den AGS Zellen, wurden das Zytoskelett der Zellen mittels Phalloidin rot und der Zellkern mit DAPI blau angefärbt. Vor Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten AGS Zellen mit *H. pylori* wiesen diese eine flächige Verteilung von c-Abl im Zytoplasma der Zellen auf (Abb. 5.18.A1-A3). Im Kern der Zellen wurde nur eine geringe Menge an EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> beobachtet. In ihrer Morphologie glichen die pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen größtenteils den nicht transfizierten Zellen (Abb. 5.18.A2). Eine Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit *H. pylori* MOI 50 für sechs Stunden führte zu der typischen Elongation *H. pylori*-infizierter Zellen. Neben der Lokalisierung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> im Zytoplasma der Zellen wurde nach Infektion

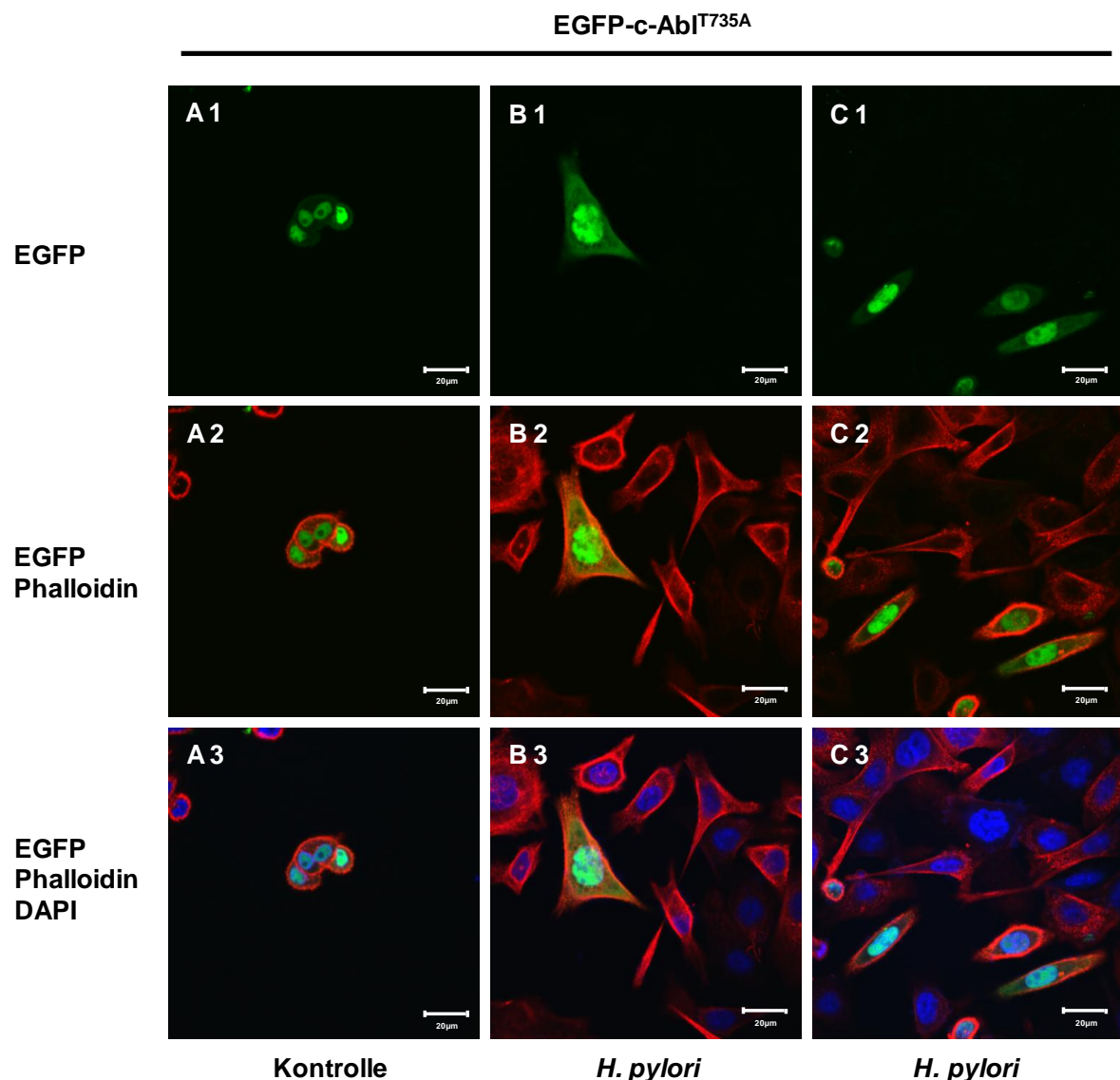
mit *H. pylori* vermehrt eine Anreicherung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> im Bereich der Zellmembran und den Zellendungen der elongierten Zellen beobachtet (Abb. 5.18.B1-B3 und C1-C3). Der Kern dieser Zellen war weitgehend ausgespart von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup>.



**Abbildung 5.18: Dokumentation pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter AGS Zellen nach sechsstündiger *H. pylori*-Infektion mittels Immunfluoreszenzanalyse:** AGS Zellen wurden mit einem pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> Vektor transfiziert und schein- (Kontrolle) (A1-A3) oder mit *H. pylori* MOI 100 für 6 Stunden (B1-B3 und C1-C3) infiziert. c-Abl wurde über EGFP (grün) sichtbar gemacht. Die Markierung des Zellkerns erfolgte durch DAPI (blau) und das Zytoskelett wurde durch den Einsatz von Phalloidin (rot) angefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Die Skalierung entspricht 20 µm.

Durch eine derartige Lokalisierung des EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> während der *H. pylori*-Infektion wurden die Konturen der Zelle durch die grüne Färbung deutlich hervorgehoben. Im Gegensatz zu den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen wiesen die pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen in den kontrollinfizierten Zellen eine deutliche Lokalisierung von EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> im Zellkern auf (Abb. 5.19.A1-A3). Die pEGFP-c-

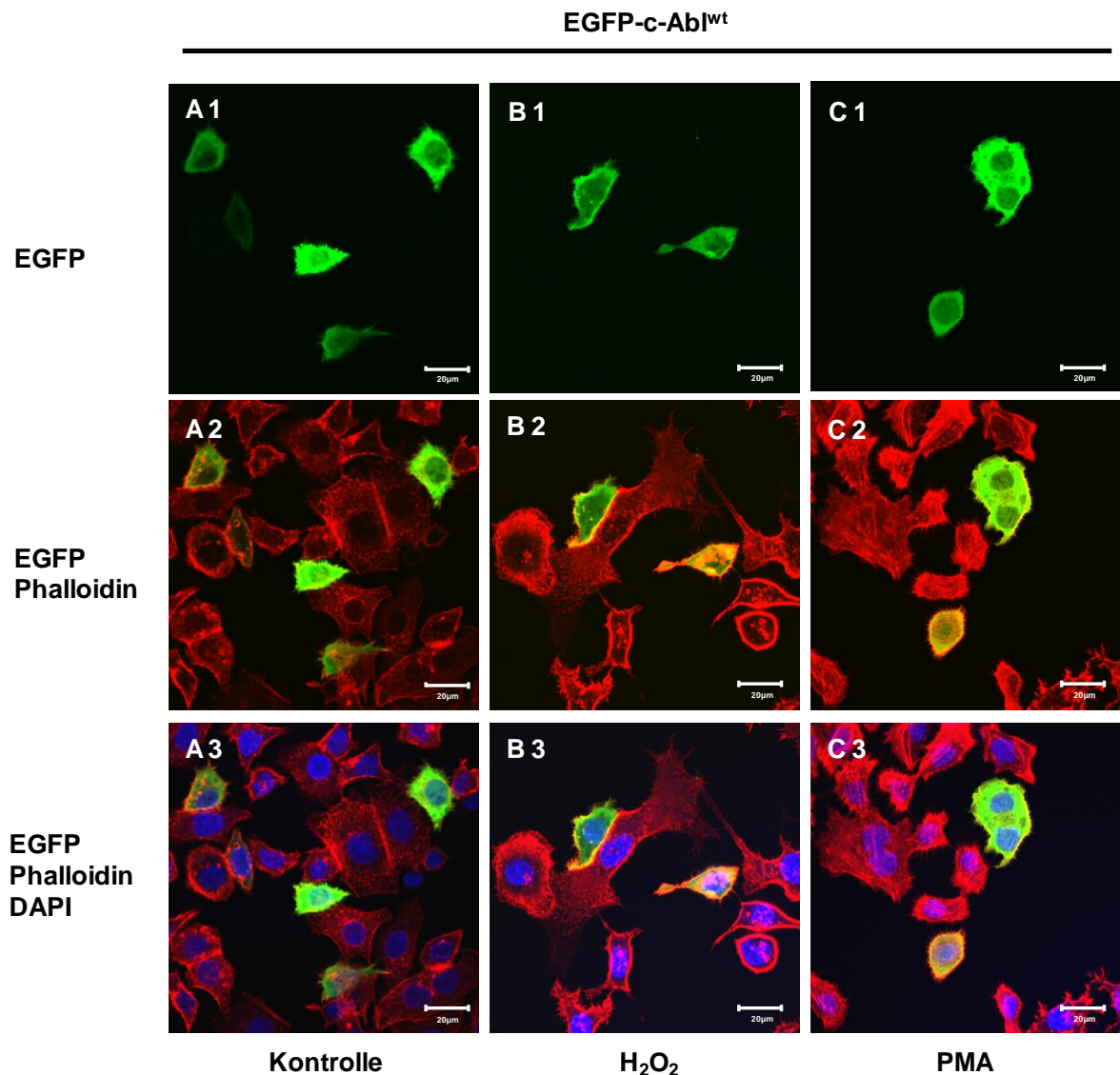
Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen wirkten wesentlich kleiner und runder als die flächigen pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden kontrollinfizierten AGS Zellen (Abb. 5.19.A1-A3).



**Abbildung 5.19: Dokumentation pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter AGS Zellen nach sechsstündiger *H. pylori*-Infektion mittels Immunfluoreszenzanalyse:** AGS Zellen wurden mit einem pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> Vektor transfiziert und schein- (Kontrolle) (A1-A3) oder mit *H. pylori* MOI 100 für 6 Stunden (B1-B3 und C1-C3) infiziert. c-Abl wurde über EGFP (grün) sichtbar gemacht. Die Markierung des Zellkerns erfolgte durch DAPI (blau) und das Zytoskelett wurde durch den Einsatz von Phalloidin (rot) angefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Die Skalierung entspricht 20 µm.

Nach Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit *H. pylori* mit MOI 50 für sechs Stunden, wurde auch hier eine Elongation der Zellen beobachtet, jedoch war diese nicht so ausgeprägt wie bei den *H. pylori*-infizierten pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen (Abb. 5.19.B1-B3 und C1-C3). Betrachtete man die Lokalisierung von EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>

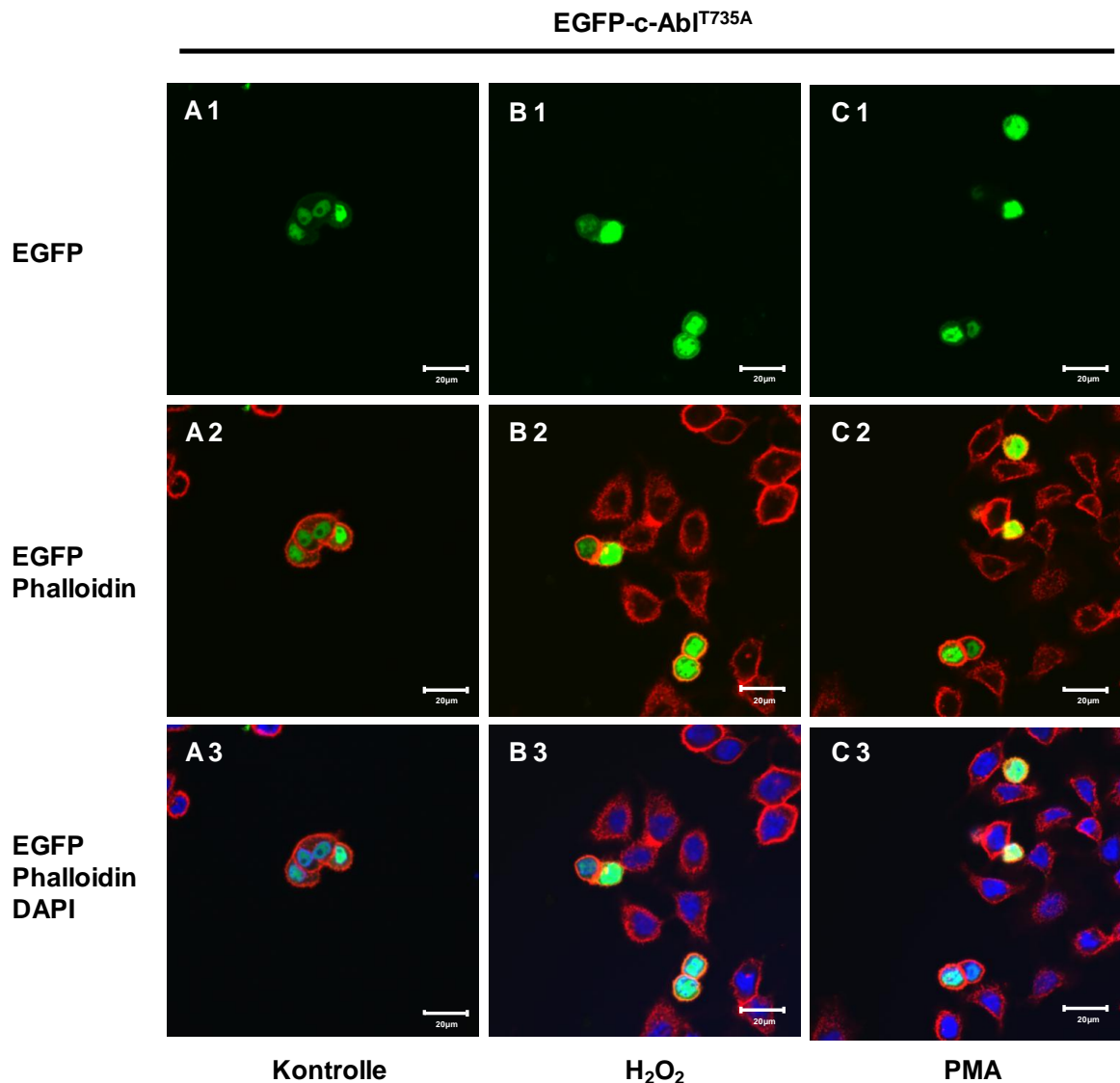
in den *H. pylori*-infizierten AGS Zellen, so wurde neben der deutlichen Kernlokalisierung auch eine leichte Lokalisierung im Zytoplasma detektiert. Diese war jedoch geringer als die des EGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-Proteins in den *H. pylori*-infizierten AGS Zellen und erstreckte sich flächig über das gesamte Zytoplasma der Zellen (Abb. 5.19.B1-B3 und C1-C3 und Abb. 5.21.B1-B3 und C1-C3).



**Abbildung 5.20: Dokumentation pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter AGS Zellen nach Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PMA mittels Immunfluoreszenzanalyse.** AGS Zellen wurden mit einem pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> Vektor transfiziert und nicht- (Kontrolle für 6 Stunden) (A1-A3), mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B1-B3) oder mit 100 nM PMA (C1-C3) für jeweils eine Stunde stimuliert. c-Abl wurde über EGFP (grün) sichtbar gemacht. Die Markierung des Zellkerns erfolgte durch DAPI (blau) und das Zytoskelett wurde durch den Einsatz von Phalloidin (rot) angefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Die Skalierung entspricht 20 µm.

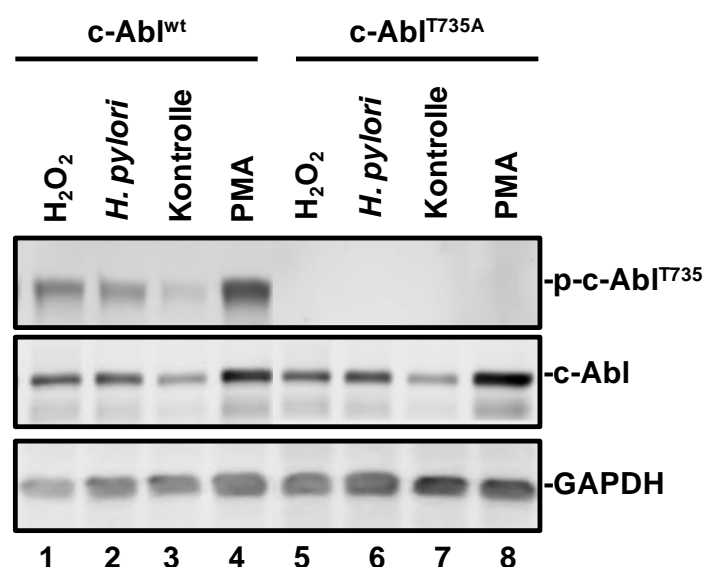
Nachdem die pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- und pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen nach kontroll- und *H. pylori*-Infektion einen deutlichen Unterschied in Zellmorphologie und

Lokalisierung aufwiesen, stellte sich die Frage nach der Lokalisierung der beiden Proteine während einer Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder PMA. Um dies zu eruieren, wurden AGS Zellen mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> transfiziert und mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  500 mM oder PMA 100 nM für eine Stunde stimuliert und mittels Laser Scan Mikroskop analysiert (Abb. 5.20 und 5.21). Da dies auch Teil des vorangegangenen Experimentes war, wurde die bereits gezeigte Abbildung der Kontrollzellen beider Ansätze verwendet.



**Abbildung 5.21: Dokumentation pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter AGS Zellen nach Stimulierung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder PMA mittels Immunfluoreszenzanalyse.** AGS Zellen wurden mit einem pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> Vektor transfiziert und nicht- (Kontrolle für 6 Stunden) (A1-A3), mit 500 µM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (B1-B3) oder mit 100 nM PMA (C1-C3) für jeweils eine Stunde stimuliert. c-Abl wurde über EGFP (grün) sichtbar gemacht. Die Markierung des Zellkerns erfolgte durch DAPI (blau) und das Zytoskelett wurde durch den Einsatz von Phalloidin (rot) angefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Die Skalierung entspricht 20 µm.

Eine Inkubation der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten AGS Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultierte in einer weitestgehend zytoplasmatischen Anreicherung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> (Abb. 5.20.B1-B3). Die Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Ausbildung von nadelähnlichen Strukturen am Rande der Zellen unter Beibehalten ihrer flächigen Morphologie. Die Stimulierung mit PMA führte zu einem ähnlichen Phänotyp und Verteilung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> in der Zelle (Abb. 5.20, C1-C3). Der abgerundete Phänotyp der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden kontrollinfizierten AGS Zellen verstärkte sich im Zuge der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und PMA-Stimulierung. Die Behandlung der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen führte sowohl bei den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- als auch bei den PMA-stimulierten Zellen zu einem Abkugeln der Zellen (Abb. 5.21.B1-B3 und C1-C3). Auffällig war in beiden Ansätzen der reduzierte zytoplasmatische Bereich der stimulierten Zellen. Parallel zu den Immunfluoreszenzanalysen wurde die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- und pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen in einem Western Blot überprüft (Abb. 5.22). Nach Kontrollinfektion der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen wiesen diese eine leichte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf (Abb. 5.22, Spur 3, p-c-Abl<sup>T735</sup>).



**Abbildung 5.22: Western Blot Analyse der in Abb. 5.18-5.21 mittels Immunfluoreszenzanalyse dokumentierten Zellen.** Die Zelllysate der in Abbildung 5.18-5.21 mittels Immunfluoreszenzanalyse dokumentierten Zellen wurden mittels Western Blot auf die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> untersucht. Dies erfolgte durch Verwendung eines spezifischen p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörpers. Der Nachweis von c-Abl wurde mittels anti-c-Abl (24-11) Antikörper erbracht. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Eine Infektion mit *H. pylori* mit MOI 50 für sechs Stunden resultierte in einem Verstärken der Phosphorylierung und gleichzeitig einem Anstieg des c-Abl Proteingehaltes (Abb. 5.22, Spur 2, p-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl). Diese Verstärkung der Phosphorylierung und der Anstieg des c-Abl Proteingehalts wurden bereits in Abbildung 5.3 beschrieben. Eine Stimulierung der pEGFP-

c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkte eine ähnlich starke Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> wie nach einer sechsstündigen *H. pylori*-Infektion (Abb. 5.22, Spur 1, p-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl). Eine Stimulierung der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit PMA bewirkte die stärkste Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (Abb. 5.22, Spur 4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die PMA-Stimulierung der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen führte zudem zu der stärksten Akkumulierung von c-Abl bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge (GAPDH) (Abb. 5.22, Spur 1 – 4, c-Abl und GAPDH). In den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen konnte zu keiner Zeit eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> detektiert werden (Abb. 5.22, Spur 5-8, p-c-Abl<sup>T735</sup>). In Bezug auf den Gehalt an c-Abl in den jeweiligen Ansätzen glichen die pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen (Abb. 5.22, Spur 5-6, c-Abl). Die kontrollinfizierten Zellen wiesen auch in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen wenig c-Abl auf (Abb. 5.22, Spur 7, c-Abl). Eine Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder *H. pylori* bewirkte einen Anstieg des EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteingehalts, der jedoch von dem der PMA-stimulierten Zellen übertroffen wurde (Abb. 5.22, Spur 5, 6 und 8, c-Abl).

Anhand der Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> und EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> bereits einen Unterschied in den kontrollinfizierten AGS Zellen aufwies. Während EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> eine stärkere Lokalisierung im Zytoplasma zeigte, konzentrierte sich die Lokalisierung von EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> vermehrt auf den Zellkern. Eine Infektion mit *H. pylori* bewirkte die Lokalisierung des EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> im Bereich der Zellmembran des Zytoplasmas. EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> war nach *H. pylori*-Infektion vornehmlich im Zellkern lokalisiert mit einer schwächeren flächigen Verteilung im Zytoplasma. Eine Infektion mit *H. pylori* bewirkte eine weitaus stärkere Elongierung der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen im Gegensatz zu der in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen hervorgerufenen Elongierung. Eine Stimulierung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PMA bewirkte in den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen eine Anreicherung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> im Zytoplasma und die Ausbildung nadelähnlicher Strukturen in der Zellmembran. Die Stimulierung der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PMA intensivierte den abgerundeten Phänotyp der Zellen mit einem deutlich reduzierten Zytoplasma. Eine Western Blot-Analyse der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- und pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen zeigte das stärkste p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signal nach PMA-Stimulierung der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen. Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>, hervorgerufen durch Stimulierung mit *H. pylori*, glich in ihrer Intensität der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulierung der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen. Die pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen wiesen zu keiner Zeit ein Phosphorylierungssignal an c-Abl<sup>T735</sup> auf. Eine Stimulierung mit PMA bewirkte sowohl in den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- als auch den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen die stärkste Akkumulierung von c-Abl. Eine Stimulierung mit *H. pylori* und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultierte in einer etwas abgeschwächten Akkumulierung, gemessen an PMA.

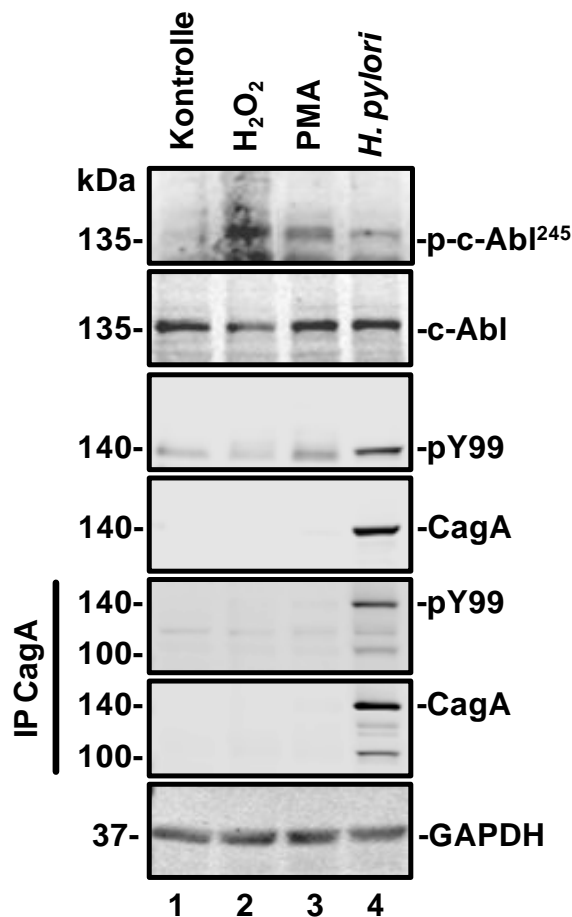


### 5.5 Aktivierung von c-Abl durch *H. pylori*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PMA

Nachdem anhand der Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden konnte, dass EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> und EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> sich in ihrer Lokalisierung innerhalb der Zelle unterscheiden, wurde die Aktivierung von c-Abl durch Stimulierung der Zellen mit PMA und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Western Blot eruiert (Abb. 5.23). Die Aktivität von c-Abl wurde anhand der Phosphorylierung an Tyrosin<sup>245</sup> (Y<sup>245</sup>) gemessen. Für eine vollständige Aktivierung der Kinaseaktivität von c-Abl bedarf es dieser Phosphorylierung von Tyrosin<sup>245</sup> (Y<sup>245</sup>) in der SH2-Verbindungsregion zwischen SH2- und Kinase-Domäne (Brasher und van Etten, 2000). Als weiterer Aktivitätsnachweis von c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion wurde die Tyrosinphosphorylierung des *H. pylori*-Pathogenitätsfaktors CagA nach dessen Immunpräzipitation mit einem anti-CagA Antikörper gemessen. CagA stellt während einer *H. pylori*-Infektion ein Substrat von c-Abl dar (Pope *et al.*, 2007). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen kontroll- oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für sechs Stunden infiziert oder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM oder PMA 100 nM für eine Stunde stimuliert. Die Detektion der c-Abl Aktivierung erfolgte mit Hilfe eines anti-p-c-Abl<sup>Y245</sup> Antikörpers im Western Blot (Abb. 5.23. Spur 1-4, p-c-Abl<sup>Y245</sup>). In den kontrollinfizierten AGS Zellen konnte keine Phosphorylierung an c-Abl<sup>Y245</sup> im Western Blot festgestellt werden (Abb. 5.23. Spur 1, p-c-Abl<sup>Y245</sup>). Das stärkste p-c-Abl<sup>Y245</sup>-Signal wurde durch Stimulierung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert (Abb. 5.23. Spur 2, p-c-Abl<sup>Y245</sup>). Gemessen an der Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkte die Behandlung mit PMA eine etwas schwächere Phosphorylierung an c-Abl<sup>Y245</sup> (Abb. 5.23. Spur 3, p-c-Abl<sup>Y245</sup>). Die Intensität des *H. pylori*-induzierten Phosphorylierungs-Signals c-Abl<sup>Y245</sup> lag zwischen dem der kontrollinfizierten Zellen und der PMA-stimulierten Zellen (Abb. 5.23. Spur 4, p-c-Abl<sup>Y245</sup>). Im Bezug auf den Gehalt an c-Abl in den AGS Zellen wiesen nur die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierten Zellen eine etwas geringere Menge an c-Abl bei gleichbleibendem Gesamtproteingehalt (GAPDH) auf (Abb. 5.23. Spur 2, c-Abl und GAPDH). In den kontroll- und *H. pylori*-infizierten und PMA-stimulierten AGS Zellen wiesen die Zellen einen ähnlichen Gehalt an c-Abl-Protein auf (Abb. 5.23. Spur 1-4, c-Abl). Neben der Phosphorylierung an c-Abl<sup>Y245</sup> wurde die Tyrosinphosphorylierung des bakteriellen Faktors CagA mit einem anti-panTyrosin Antikörper detektiert (Abb. 5.23. Spur 1-4, pY99). Zu diesem Zweck wurde CagA mit einem anti-CagA Antikörper immunpräzipitiert und im Western Blot die Tyrosinphosphorylierung mit diesem anti-panTyrosin Antikörper an CagA (pY99) detektiert (Abb. 5.23. Spur 1-4, IP CagA, pY99). Eine Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori* mit anschließender Immunpräzipitation von CagA wies eine deutliche Tyrosinphosphorylierung des präzipitierten CagA bei einer Bandengröße von 140 kDa auf (Abb. 5.23. Spur 4, IP CagA, CagA). Neben dem Tyrosinphosphosignal bei einer Bandengröße von 140 kDa wurden zwei weitere schwächere Phosphosignale bei einer Bandengröße von 100 kDa und ca. 115 kDa im Western Blot detektiert (Abb. 5.23. Spur 4, IP CagA, pY99). Eine Analyse des Western Blots mit einem



anti-CagA Antikörper wies neben einer starken 140 kDa großen Bande eine Bande in der Größe von 100 kDa und zwei weitere Banden in der Größe von 115-120 kDa auf (Abb. 5.23. Spur 4, IP CagA, CagA).



**Abbildung 5.23: Western Blot Analyse von AGS Zellen nach Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA oder *H. pylori*:** AGS Zellen wurden nicht (Spur 1), mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder mit 100 nM PMA für eine Stunde oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für sechs Stunden stimuliert. Im Anschluss wurde die c-Abl Aktivierung im Western Blot mittels anti c-Abl<sup>Y245</sup> Antikörpers detektiert. Der Nachweis von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper. Die Tyrosinphosphorylierung des bakteriellen CagAs erfolgte durch Immunpräzipitation von CagA (IP CagA) mittels anti-CagA Antikörper und anschließender Inkubation mit einem pY99 Antikörper. Im Gesamtzelllysat wurde die Tyrosinphosphorylierung mit einem pY99 Antikörper und bakterielles CagA mit einem CagA Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Die Inkubation des Gesamtzelllysats mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper pY99 zeigte im Western Blot ein starkes Phosphotyrosinsignal von CagA bei einer Bandengröße von 140 kDa in den *H. pylori* infizierten Zellen (Abb. 5.23. Spur 4, pY99).

In den Gesamtzelllysaten der kontrollinfizierten, PMA- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulierten AGS Zellen konnte ebenfalls im Western Blot ein leichtes Phosphotyrosinsignal mit dem pY99 Antikörper bei circa 140 kDa detektiert werden (Abb. 5.23. Spur 1-3, pY99).

Da diese Zellen nicht mit *H. pylori* infiziert wurden, wäre dies durch die Tyrosinphosphorylierung anderer zellulärer Proteine von einer Größe von ca. 140 kDa zu erklären (Abb. 5.23. Spur 1-3, pY99). Nach Detektion von bakteriellem CagA in den Gesamtzelllysaten mit einem spezifischen anti-CagA Antikörper und Überlagerung der Banden des CagA- und pY99 Antikörpers im Western Blot, wurde das pY99-Signal in den Zelllysaten der *H. pylori*-infizierten AGS Zellen in der gleichen Größe wie CagA bestätigt.

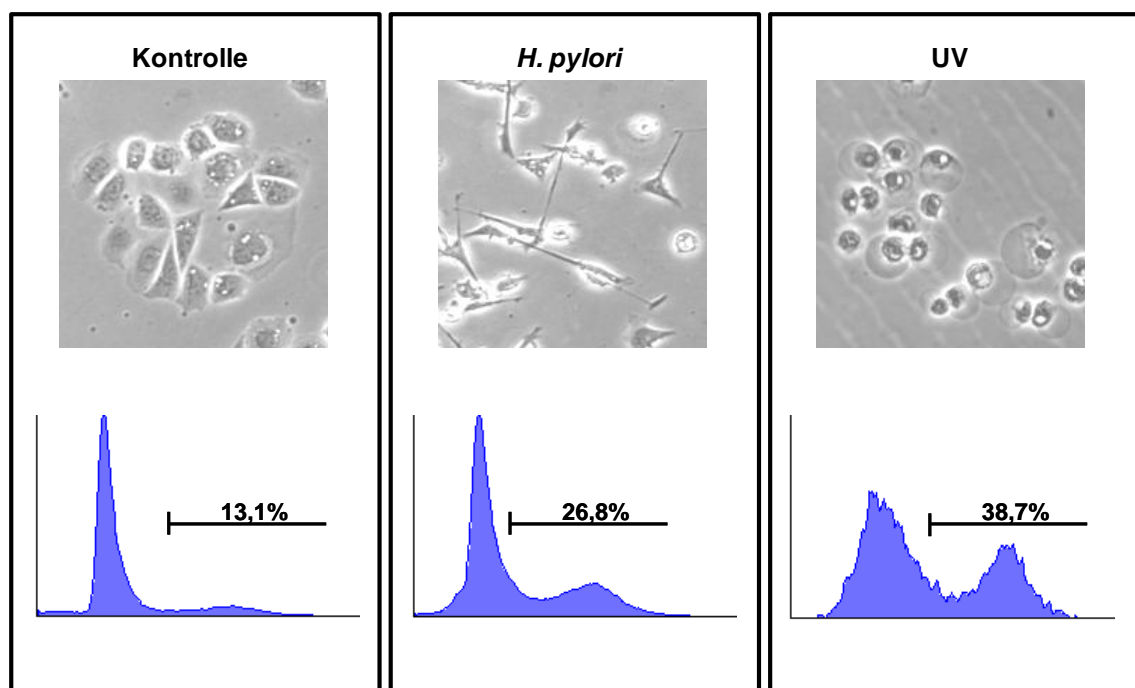
Anhand dieses Versuchs konnte gezeigt werden, dass sowohl *H. pylori*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch PMA eine für die Aktivierung an c-Abl notwendige Phosphorylierung an c-Abl<sup>Y245</sup> hervorrufen. Desweiteren wiesen *H. pylori*-infizierte Zellen eine deutliche Tyrosinphosphorylierung des *H. pylori* Pathogenitätsfaktors CagA in der Bandengröße von 140 kDa auf. In einem nächsten Schritt wurde die Auswirkung der Aktivierung von c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion untersucht, wobei der Fokus auf der Induktion von Apoptose in Abhängigkeit von der c-Abl<sup>T735</sup> Phosphorylierung in infizierten gastralen Epithelzellen lag.

## 5.6 *H. pylori* induziert Apoptose in human epithelialen Adenocarcinoma

### Zellen

Eine Infektion gastraler Epithelzellen mit *H. pylori* bewirkt sowohl die Aktivierung von pro- als auch anti-apoptotischen Prozessen in den infizierten Zellen (Jang *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2001). Anhand der folgenden Experimente sollte herausgefunden werden, inwiefern eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> Einfluss auf pro- und anti-apoptotische Prozesse in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen ausübt. In einem ersten Schritt wurden AGS Zellen mittels Annexin-V-Phycoerythrin (Annexin-V-PE) Färbung auf die Induktion von Apoptose untersucht (Abb. 5.24). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen scheininfiziert (Kontrollzellen) oder mit MOI 100 für 24 Stunden mit *H. pylori* infiziert (Abb. 5.24.A, B). Als Positivkontrolle für die Annexin-V-PE Färbung wurden Zellen mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) bestrahlt und in Zellkulturmedium ohne FKS für 24 Stunden kultiviert (Abb. 5.24.C). Mittels Durchflusszytometrie (*fluorescent activated cell sorting* - FACS) wurde die Annexin-V-PE Färbung in dem PE-Kanal des FACS-Geräts gemessen. In einem Histogramm wurde repräsentativ das Ergebnis eines von drei Einzelversuchen dargestellt. Die Zellzahl wurde auf der Y-Achse und die Annexin-V-PE Färbung der markierten Zellen auf der X-Achse dargestellt. Die Annexin-V-PE Färbung der AGS Zellen resultierte in zwei Höchstwerten des Histogramms. Der erste beinhaltete die lebendigen Zellen und der zweite markierte die apoptotischen Zellen. In den Kompensationskontrollen wurden die apoptotischen Zellen des zweiten Höchstwertes mit einem Gate definiert und dieses Gate in allen Messungen

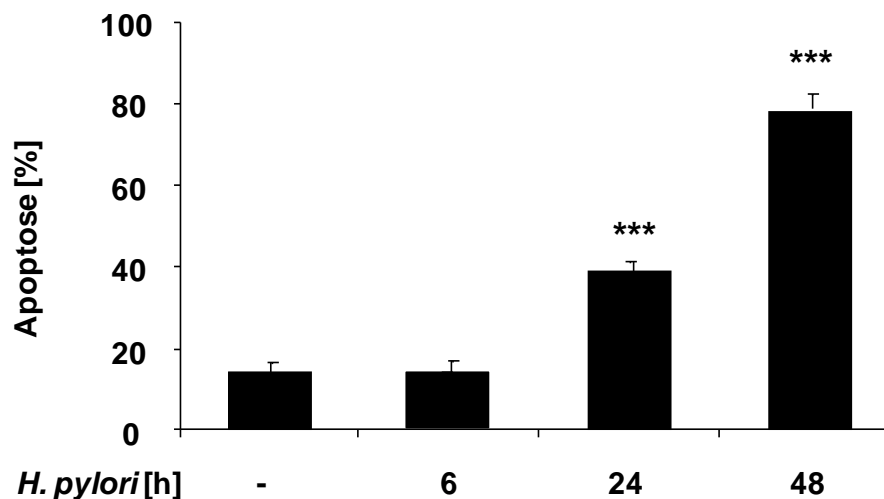
innerhalb einer Messreihe beibehalten. Der prozentuale Anteil der Zellen in diesem Viereck wurde als Apoptose [%] bezeichnet (Abb. 5.24.A, B, C). Hierbei zeigte sich, dass auch die kontrollinfizierten AGS Zellen nach 24 Stunden Kultivieren mit Medium ohne FKS 13,1% apoptotische Zellen aufwiesen (Abb. 5.24.A). Neben der Annexin-V-PE Messung wurde das Aussehen der Zellen mit einem Inversmikroskop dokumentiert. Die kontrollinfizierten Zellen wiesen einen weitgehend intakten Zellverband auf. Nur vereinzelt schienen sich die Zellen aus dem Verband zu lösen und abzurunden. Die UV-Licht behandelten Zellen wiesen eine für Apoptose typische blasige Zellmorphologie auf.



**Abb. 5.24: Annexin-V-PE Messung in AGS Zellen mittels FACS-Analyse:** AGS Zellen wurden **A.)** schein- oder **B.)** mit *H. pylori* für 24 Stunden infiziert oder **C.)** mit UV-Licht bestrahlt und weitere 24 Stunden kultiviert. Im Anschluss daran wurden die apoptotischen Zellen mit Annexin-V-PE angefärbt. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde mittels FACS Messung bestimmt und in einem Histogramm dargestellt. Die Morphologie der Zellen wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 10facher Vergrößerung dokumentiert.

Die FACS-Messung der UV-Licht-bestrahlten Zellen ergab einen Apoptose-Wert von 38,7% (Abb. 5.24.C). Die Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori* mit MOI 100 für 24 Stunden resultierte in einem sehr heterogenen Bild. Neben den stark elongierten Zellen fand sich eine Reihe abgekugelter Zellen im Zellkulturmedium (Abb. 5.24.B). Die anschließende FACS-Messung resultierte in 26,8% Apoptose der *H. pylori*-infizierten AGS Zellen. Für eine einfachere Darstellung der Ergebnisse der Annexin-V-PE Messung im FACS-Gerät, wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen für die folgenden Experimente in einem Graphen als Balkendiagramm dargestellt. Zu Beginn erfolgte eine generelle Bestimmung der *H. pylori*-induzierten Apoptose in den AGS Zellen (Abb. 5.25). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen

kontroll- oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für sechs, 24 und 48 Stunden infiziert und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-PE Färbung im FACS-Gerät ermittelt. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Versuchen in Triplikaten durchgeführt. Für das Ergebnis der Triplikate eines Versuchs wurde der Mittelwerte bestimmt und dieser als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt. Eine Infektion der Zellen mit *H. pylori* für sechs Stunden bewirkte keinen signifikanten Unterschied zwischen den infizierten AGS Zellen mit 14% Apoptose und den kontrollinfizierten AGS Zellen mit 13% Apoptose. In Abb. 5.25 wurde in dem Graphen das Ergebnis der sechs Stunden kontrollinfizierten AGS Zellen dargestellt. Für die 24 und 48 Stunden *H. pylori*-infizierten Zellen wurde anhand der Sternchen die Signifikanz zu der jeweiligen Kontrolle angezeigt und die kontrollinfizierten AGS Zellen nicht in Form eines Balkendiagramms graphisch dargestellt.

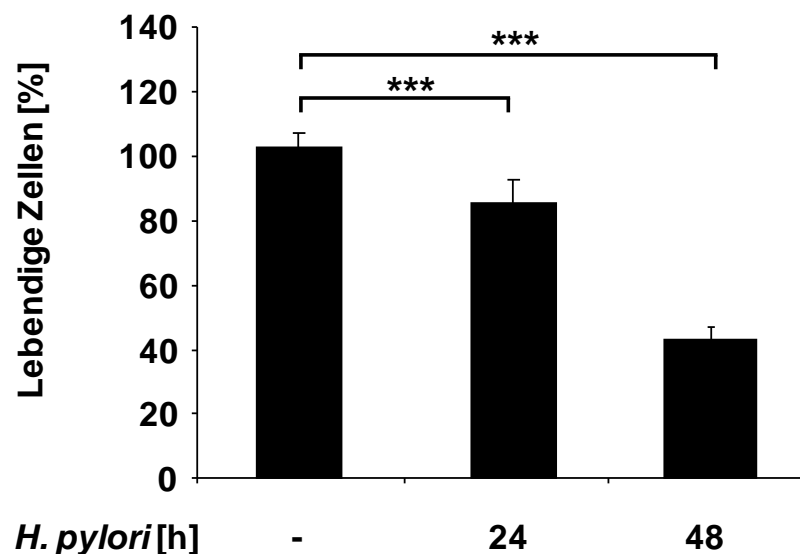


**Abbildung 5.25: Graphische Darstellung der Annexin-V-PE Messung mittels FACS-Analyse nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion gastraler Epithelzellen:** AGS Zellen wurden schein- (-) oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für sechs, 24 und 48 Stunden infiziert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (Apoptose [%]) wurde im FACS durch eine Annexin-V-PE Färbung bestimmt. Die Ergebnisse von Triplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . Diese bezieht sich auf *H. pylori* infizierte Zellen (schwarze Balken) gegenüber den Kontrollen der jeweiligen Zeitwerte (nur Kontrolle sechs Stunden gezeigt).

Eine 24-stündige *H. pylori*-Infektion der AGS Zellen resultierte in 39% Apoptose. Die kontrollinfizierten AGS Zellen wiesen 16% Apoptose nach 24 Stunden auf (Abb. 5.25). Eine 48-stündige Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori* resultierte in 78% Apoptose. Die kontrollinfizierten AGS Zellen wiesen nach 48 Stunden 30% Apoptose auf.

Anhand dieser ersten Messung konnte gezeigt werden, dass eine Infektion der gastralen Zelllinie AGS mit *H. pylori* mit MOI 100 in einem Zeitraum von 48 Stunden einen deutlichen Anstieg von Apoptose in den infizierten Zellen auf 78% bewirkt, wohingegen die kontrollinfizierten AGS Zellen zu dieser Zeit 30% Apoptose aufwiesen.

Neben der Bestimmung der Apoptose während einer *H. pylori*-Infektion durch die Annexin-V-PE Färbung, wurde eine weitere Analysemethode angewandt. Mit Hilfe eines Zellviabilitäts-Tests wurde der prozentuale Anteil lebender Zellen nach einer *H. pylori*-Infektion bestimmt. Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen kontrollinfiziert oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für 24 und 48 Stunden infiziert und der Anteil lebendiger Zellen [%] bestimmt. Die kontrollinfizierten AGS Zellen wurden als 100% lebendige Zellen gewertet (Abb. 5.26).



**Abbildung 5.26: Graphische Darstellung des Zellviabilitäts-Tests nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion gastraler Epithelzellen:** AGS Zellen wurden schein- mit *H. pylori* mit MOI 100 für 24 und 48 h infiziert. Der prozentuale Anteil der lebendigen Zellen (lebendige Zellen [%]) wurde mit Hilfe eines MTT Assays bestimmt und mittels Mikrotiterplattenleser ausgewertet. Die Ergebnisse von Quadruplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Eine Infektion der AGS Zellen mit *H. pylori* mit MOI 100 für 24 Stunden führte zu einer Abnahme der lebenden Zellen auf 88%. Bei fortwährender *H. pylori*-Infektion sank die Zahl lebender Zellen nach 48 Stunden auf 43%.

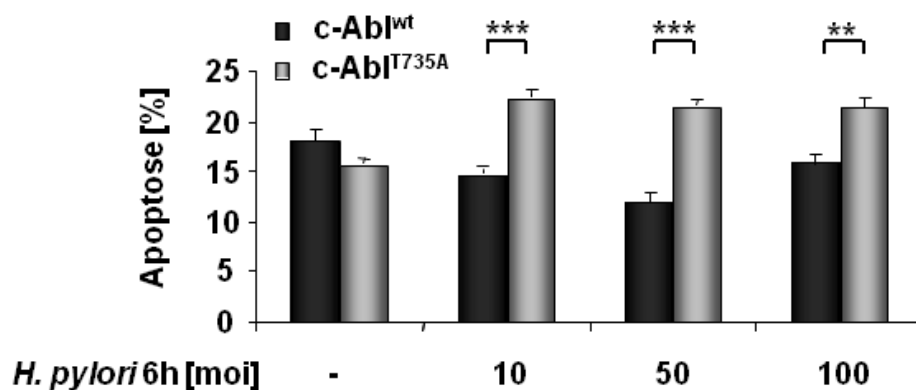
Anhand dieses Zellviabilitäts-Tests konnte gezeigt werden, dass eine Infektion der gastralen Zelllinie AGS mit *H. pylori* mit MOI 100 in einem Zeitraum von 48 Stunden eine deutliche Reduktion der lebendigen Zellen auf 43% bewirkt.

Die Werte der Ergebnisse der Annexin-V Messung und des Zellviabilitäts-Tests unterschieden sich zwar, jedoch zeigten die Ergebnisse aus beiden Analysemethoden die gleiche Tendenz. Mit beiden Analysemethoden konnte eine Reduktion lebendiger Zellen nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion aufgezeigt werden.

## 5.7 Transfektion der c-Abl<sup>T735A</sup> Mutante erhöht die *H. pylori*-induzierte

### Apoptose in human epithelialen Adenocarcinoma Zellen

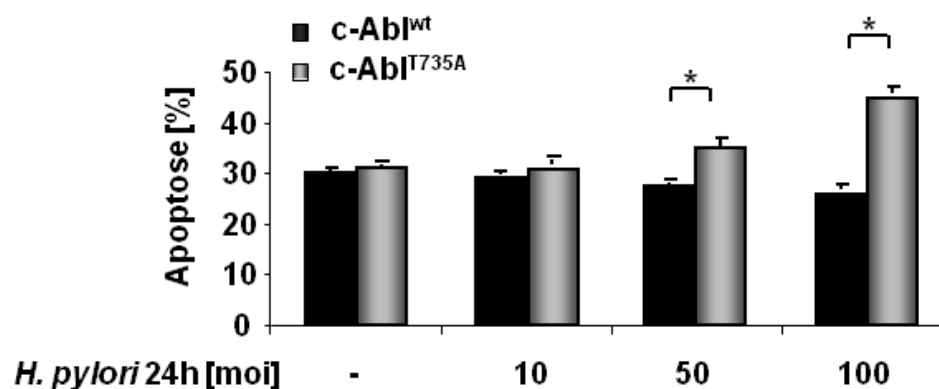
Im nächsten Schritt wurde ein Einfluss der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> auf Apoptose während einer insgesamt 48-stündigen *H. pylori*-Infektion untersucht. Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> transfiziert und nach 24 Stunden kontrollinfiziert (-) oder mit *H. pylori* mit MOI 10, 50 und 100 für sechs, 24 und 48 Stunden infiziert (Abb. 5.27). Im Anschluss daran wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-PE markiert und im FACS-Gerät analysiert. In diesem Experiment wurden zuvor die pEGFP-transfizierten AGS Zellen in dem grünen Kanal im FACS-Gerät ausgelesen und anschließend die Annexin-V-PE markierten AGS Zellen bestimmt.



**Abbildung 5.27: Graphische Darstellung der Annexin-V-PE Messung mittels FACS-Analyse nach sechsstündiger *H. pylori*-Infektion pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen:** AGS Zellen wurden mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> (schwarze Balken) oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> (graue Balken) transfiziert und schein- (-) oder für sechs Stunden mit *H. pylori* MOI 10, 50 oder 100 stimuliert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (Apoptose [%]) wurde im FACS durch eine Annexin-PE Färbung bestimmt. Die Ergebnisse von Triplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

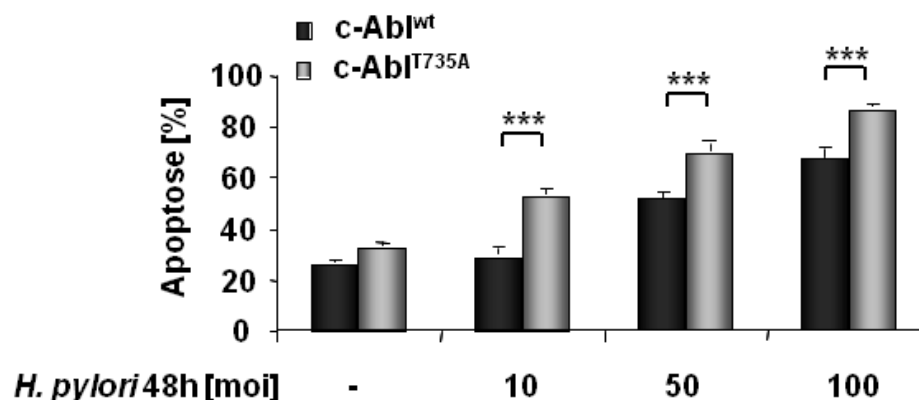
Nach sechs Stunden wiesen die kontrollinfizierten AGS Zellen der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen 18% Apoptose und der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen 15,4% Apoptose auf (Abb. 5.27, pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). Eine Infektion mit *H. pylori* mit MOI 10 für sechs Stunden resultierte in 15% Apoptose der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen und in 22% Apoptose der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen. Eine Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit *H. pylori* MOI 50 und 100 für sechs Stunden wies 12% und 16% Apoptose auf (Abb. 5.27, EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken). Die FACS-Messung der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen mit *H. pylori* MOI 50 und 100 für sechs Stunden zeigte 21% und 21%

Apoptose (Abb. 5.27, EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). Nach 24 Stunden wiesen die kontrollinfizierten der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen 30% Apoptose auf und die pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen 31% Apoptose (Abb. 5.28, EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). Eine Infektion mit *H. pylori* mit MOI 10 für 24 Stunden resultierte in 29% Apoptose der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen und 31% Apoptose der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen. Eine 24-stündige Infektion mit *H. pylori* mit MOI von 50 führte zu 27% Apoptose in den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen und zu 35% Apoptose in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen (Abb. 5.28, EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). Eine *H. pylori*-Infektion mit MOI 100 für 24 Stunden führte zu 26% Apoptose der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- und 45% Apoptose der EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen (Abb. 5.28, EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken).



**Abbildung 5.28:** Graphische Darstellung der Annexin-V-PE Messung mittels FACS-Analyse nach 24-stündiger *H. pylori*-Infektion pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen: AGS Zellen wurden mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> (schwarze Balken) oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> (graue Balken) transfiziert und schein- (-) oder für 24 Stunden mit *H. pylori* MOI 10, 50 oder 100 stimuliert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (Apoptose [%]) wurde im FACS durch eine Annexin-PE Färbung bestimmt. Die Ergebnisse von Triplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05.

Nach 48 Stunden wiesen die kontrollinfizierten AGS Zellen der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen 25% Apoptose und die der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierten Zellen 33% Apoptose auf (Abb. 5.29, EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). Eine 48-stündige *H. pylori*-Infektion mit MOI 10 führte die den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen zu 29% Apoptose und in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen zu 53% Apoptose.



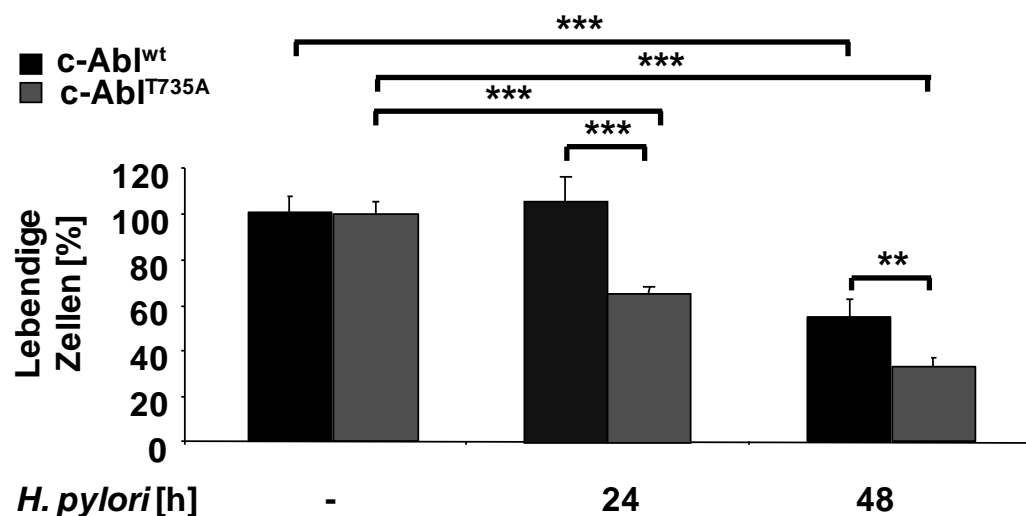
**Abbildung 5.29: Graphische Darstellung der Annexin-V-PE Messung mittels FACS-Analyse nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen:** AGS Zellen wurden mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> (schwarze Balken) oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> (graue Balken) transfiziert und schein- (-) oder für 48 Stunden mit *H. pylori* MOI 10, 50 oder 100 stimuliert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (Apoptose [%]) wurde im FACS durch eine Annexin-PE Färbung bestimmt. Die Ergebnisse von Triplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Eine *H. pylori*-Infektion mit MOI 50 und 100 für 48 Stunden resultierte in den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen in 51% und 68% Apoptose und in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen in 69% und 86% Apoptose (Abb. 5.29, EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken).

Anhand dieser 48-stündigen *H. pylori*-Infektion mit anschließender Bestimmung der apoptotischen Zellen mittels AnnexinV-PE Färbung im FACS-Gerät, konnte ein Unterschied in der Apoptose der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- und pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen aufgezeigt werden. In den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen bewirkte eine sechsstündige *H. pylori*-Infektion zu MOI 10, 50 und 100 eine geringere Apoptose als in den kontrollinfizierten Zellen. In den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen resultierte eine Infektion zu MOI 10, 50 und 100 in einer geringen Steigerung der Apoptose um ca. 7% im Vergleich zu den kontrollinfizierten Zellen. Während die pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen 24 Stunden nach *H. pylori*-Infektion mit MOI 100 26% Apoptose und die kontrollinfizierten 30% Apoptose aufwiesen, führte die *H. pylori*-Infektion nach 24 Stunden in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen zu 45% Apoptose und in den kontrollinfizierten Zellen zu 31% Apoptose. 48 Stunden nach Infektion wiesen die pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen bei *H. pylori* MOI 50 und 100 mit 51% und 68% Apoptose erstmals mehr apoptotische Zellen als in den kontrollinfizierten Zellen mit 25% Apoptose auf. Die pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen wiesen bei *H. pylori* MOI 10, 50 und 100 53%, 69% und 86% Apoptose auf und in den kontrollinfizierten AGS Zellen 33%.



Nachdem anhand der AnnexinV-PE Färbung im FACS-Gerät in der Apoptose der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- und pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen ein deutlicher Unterschied während einer *H. pylori*-Infektion aufgezeigt werden konnte, erfolgte eine Bestimmung der lebendigen Zellen mittels Zellviabilitäts-Test. Zu diesem Zweck wurden die stabil transfizierten Zelllinien AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>, die im Zuge dieser Arbeit generiert wurden (siehe Material und Methoden 4.1.5), in dem folgenden Zellviabilitäts-Test verwendet (Abb. 5.30). Die stabil transfizierten AGS Zellen wurden für 24 und 48 Stunden kontroll- oder mit *H. pylori* mit MOI 100 infiziert und die Zahl lebendiger Zellen mittels Zellviabilitäts-Test ermittelt. Die Kontrollen der jeweiligen Zeitwerte wurden als 100% der Gesamtzellzahl angesehen. Eine 24-stündige Infektion der AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen resultierte in geringen Steigerung der lebendigen Zellen, gemessen an den kontrollinfizierten Zellen (Abb. 5.30, pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken). Die AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen wiesen 24 Stunden nach *H. pylori*-Infektion 79% lebendige Zellen auf (Abb. 5.30, pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). 48 Stunden nach *H. pylori*-Infektion wiesen die AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen 55% lebendige Zellen auf im Gegensatz zu den AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen mit 32% lebendigen Zellen (Abb. 5.30, pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, pNTAP-c-



**Abbildung 5.30: Graphische Darstellung des Zellviabilitäts-Tests nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen:** Die mit pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> (schwarze Balken) oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> (graue Balken) stabil transfizierten AGS Zellen wurden schein- oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für 24 und 48 Stunden infiziert. Der prozentuale Anteil der lebendigen Zellen (lebendige Zellen [%]) wurde mit Hilfe eines MTT Assays bestimmt und mittels Mikrotiterplattenleser ausgewertet. Die Ergebnisse von Quadruplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

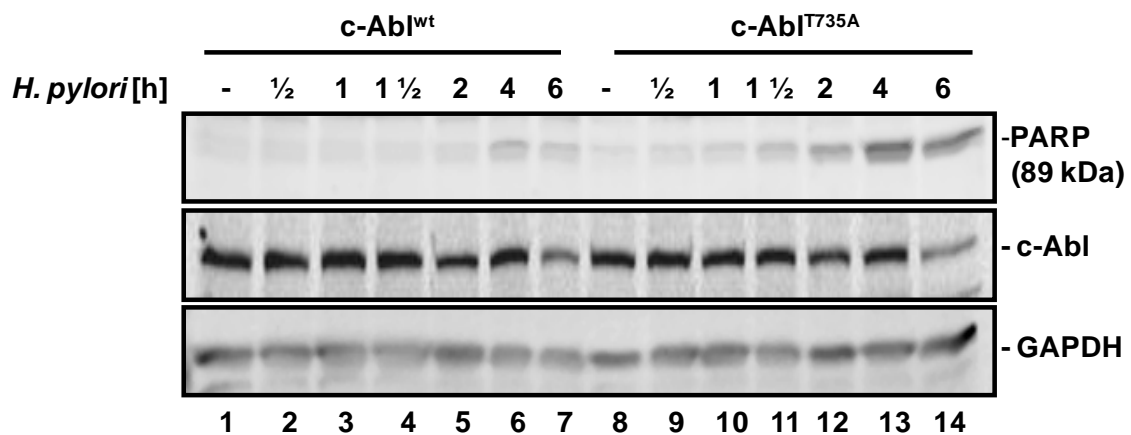
Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). Die 48-stündige *H. pylori*-Infektion der stabil transfizierten AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen mit anschließender Zellviabilitäts-Messung bestätigte den durch die Annexin-V-PE Färbung beschriebenen Effekt. Die *H. pylori*-infizierten AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen wiesen 24 Stunden nach Infektion geringfügig mehr

lebendige Zellen als die kontrollinfizierten Zellen auf. 48 Stunden nach Infektion zeigten die AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen eine Reduktion lebendiger Zellen auf 55%. Die AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen wiesen nach 24 Stunden *H. pylori*-Infektion 79% und nach 48 Stunden 32% lebendige Zellen auf.

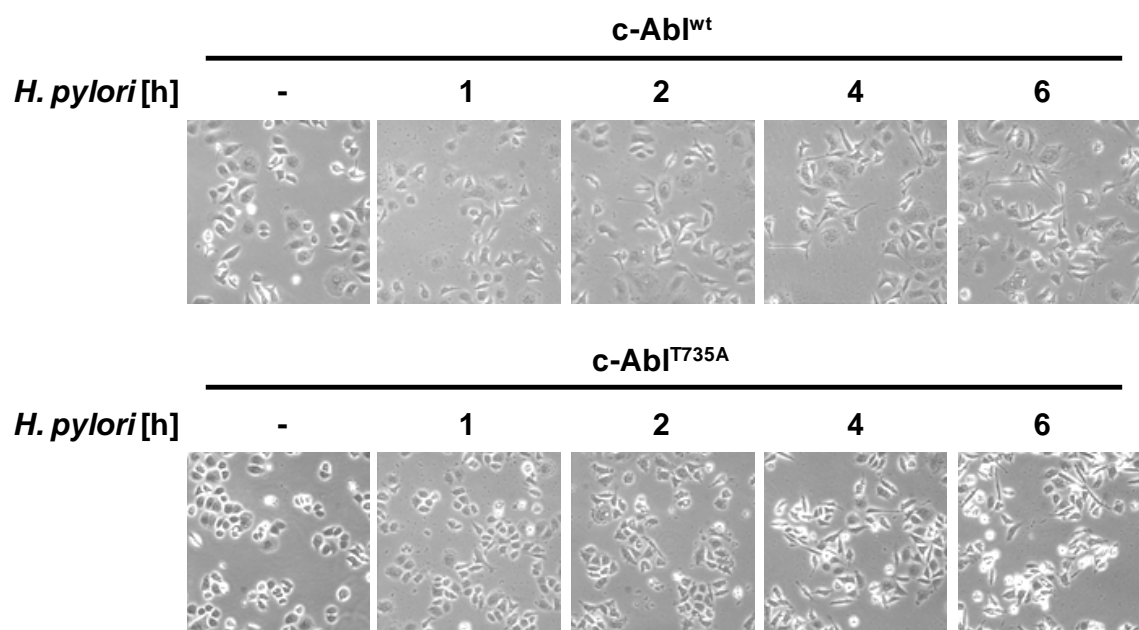
Anhand der Annexin-V-PE Messung im FACS-Gerät und der Zellviabilitäts-Messung während einer 48-stündigen *H. pylori*-Infektion konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit c-Abl<sup>T735A</sup> Plasmid-DNA transfiziert wurden, zu einem früheren Zeitpunkt ein erhöhtes Maß an Apoptose (Abb. 5.27-29), beziehungsweise weniger lebendige Zellen aufwiesen (Abb. 5.30). Um zu verifizieren, ob in den c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen zu einem früheren Zeitpunkt Apoptose initiiert wird, wurden die pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> stabil transfizierten AGS Zellen mittels Western Blot auf die Spaltung der Poly [ADP-ribose] polymerase1 (PARP1) hin untersucht (Abb. 5.31.A). Im Zuge der Apoptose wird das 116 kDa große PARP1 durch die aktivierte Caspase-3 in ein 89 und ein 24 kDa langes Fragment gespalten (Nicholson, D. W. *et al.*, 1995). Um eine solche Spaltung von PARP1 zu dokumentieren, wurden die stabil transfizierten AGS Zellen für sechs Stunden mit *H. pylori* mit MOI 100 infiziert und mittels Western Blot das Vorhandensein des 89 kDa großen PARP1 Fragments zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion detektiert (Abb. 5.31.A). Die phänotypische Veränderung der Zellen wurde mit einem Inversmikroskop dokumentiert (Abb. 5.31.B). Die kontrollinfizierten Zellen (-) der beiden Zelllinien wiesen beide kein gespaltenes PARP1 in der zu erwartenden Proteingröße auf (Abb. 5.31.A, Spur 1 und 8). Betrachtet man die Spaltung von PARP1 in den AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen, so wurde erstmals ein 89 kDa großes PARP1-Fragment nach einer Infektionszeit von vier Stunden im Western Blot detektiert (Abb. 5.31.A, Spur 6, PARP). Im Gegensatz dazu konnte in den AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen die Spaltung von PARP1 bereits eine halbe Stunde nach *H. pylori*-Infektion ein schwaches Signal in der Größe von 89 kDa beobachtet werden (Abb. 5.31.A, Spur 9, PARP). Dieses erhöhte sich im Laufe der sechsstündigen *H. pylori*-Infektion und erreichte nach eineinhalb Stunden eine Intensität, die vergleichbar mit der des PARP-Signals der AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen nach vierstündiger *H. pylori*-Infektion war (Abb. 5.31.A, Spur 6 und 11, PARP). Während sich der Gehalt an gespaltenem PARP1 in den AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen im weiteren Verlauf der *H. pylori*-Infektion weiter erhöhte, wurde in den AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen vier Stunden nach *H. pylori*-Infektion kein weiterer Anstieg an PARP in der Größe von 89 kDa beobachtet (Abb. 5.31.A, Spur 7 und 12-14, PARP). Der Gesamtgehalt an c-Abl in den jeweiligen Ansätzen wies zwischen AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und c-Abl<sup>T735A</sup> kaum Unterschiede auf (Abb. 5.31.A, Spur 1-14, c-Abl). In beiden Zelllinien wiesen die Zelllysate der sechsstündigen *H. pylori*-Infektion einen geringeren Gehalt an c-Abl Gesamtprotein auf (Abb. 5.31.A, Spur 7 und 14, c-Abl). Auch der Gehalt an zellulärem Gesamtprotein GAPDH

wies kaum Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien auf (Abb. 5.31.A, Spur 1-14, GAPDH).

A.)



B.)



**Abbildung 5.31: Western Blot Analyse pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>- und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter AGS Zellen während einer sechsständigen *H. pylori*-Infektion:** Die mit pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> stabil transfizierten AGS Zellen wurden schein- oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für die angegebenen Zeitwerte infiziert. **A.)** Die Spaltung von PARP1 wurde mittels eines anti-PARP1 Antikörpers nachgewiesen, der sowohl die lange Form (116 kDa, Bande nicht gezeigt) als auch die geschnittene Form (89 kDa) detektiert. Der Nachweis von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl Antikörper (24-11). Als Ladekontrolle diente GAPDH. **B.)** Die phänotypische Veränderung der mit pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> stabil transfizierten AGS Zellen während der Infektion mit *H. pylori* mit MOI 100 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels eines Phasenkontrastmikroskops bei 5facher Vergrößerung dokumentiert.

Die phänotypischen Veränderungen der beiden Zelllinien während der sechsständigen *H. pylori*-Infektion wurden mit einem Inversmikroskop dokumentiert (Abb. 5.31.B). Die kontrollinfizierten Zellen beider stabil transfizierter Zelllinien wiesen einen intakten Zell-Zell-Verband und eine für AGS Zellen charakteristische flächige Zellmorphologie auf (Abb.

5.31.B). Die sechsstündige *H. pylori*-Infektion der AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen führte zu einem Auseinanderweichen der Zellen, einem Lösen der Zell-Zell-Verbindungen und zum Teil starken Elongieren der infizierten Zellen. Neben den elongierten Zellen wurden einige abgekugelte Zellen während der *H. pylori*-Infektion beobachtet (erschieden kugelig, reflektierend) (Abb. 5.31.B, pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>). Im Gegensatz dazu schienen sich die AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen nicht in dem Maße zu vereinzeln und verblieben in einem gelockerten Zellverband auf der Zellkulturschale (Abb. 5.31.B, c-Abl<sup>T735A</sup>). Die AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen wiesen keine so deutliche Elongierung wie die AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen auf. Im Vergleich zu den AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen wurden mehr abgekugelte Zellen in den AGS c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion beobachtet (Abb. 5.31.B, pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>).

Zusammenfassend konnte in dieser sechsstündigen *H. pylori*-Infektion gezeigt werden, dass AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen zu einem früheren Zeitpunkt ein 89 kDa großes PARP1-Fragment aufwiesen. Nach vierstündiger *H. pylori*-Infektion wurde die stärkste Bandenintensität von PARP1 in den AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen beobachtet, wohingegen die Bandenintensität von PARP1 in den pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen diese bei vier Stunden in ihrer Intensität übertraf und bis zu sechs Stunden *H. pylori*-Infektion weiter intensivierte. Die *H. pylori*-infizierten AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen wiesen eine stärkere Elongierung und eine vermehrte Motilität auf, wohingegen die *H. pylori*-infizierten AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen einen beständigeren Zell-Zell-Verband und ein erhöhtes Maß an abgekugelten Zellen aufwiesen.

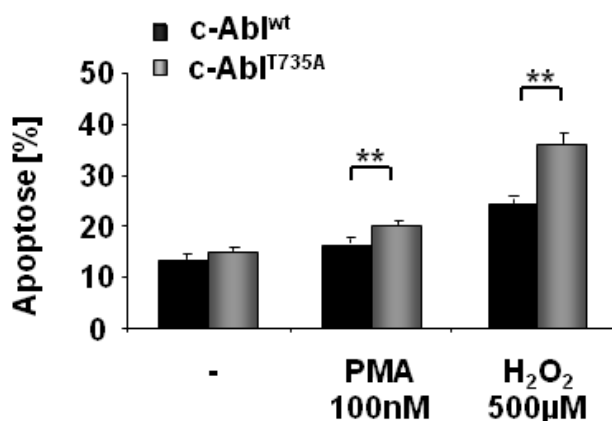
## 5.8 Transfektion der c-Abl<sup>T735A</sup>-Mutante erhöht die Induktion von Apoptose in

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- jedoch nicht PMA-stimulierten human epithelialen Adenocarcinoma

#### Zellen

Nachdem eine 48-stündige *H. pylori*-Infektion pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierender AGS Zellen deutlich mehr Apoptose in den Zellen verursachte als in pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten AGS Zellen, stellte sich die Frage, ob eine Stimulierung mit PMA oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen vergleichbaren Effekt in diesen Zellen hervorrufen würde. 2008 wurde von Nihira *et al.* gezeigt, dass HeLa Zellen, die mit c-Abl<sup>T735A</sup>-Plasmid-DNA transfiziert und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert wurden, im Vergleich zu c-Abl<sup>wt</sup>-Plasmid-DNA transfizierten HeLa Zellen eine deutlich massivere Einleitung von Apoptose aufwiesen (Nihira *et al.*, 2008). AGS Zellen wurden zu diesem Zweck mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> transient transfiziert, nach 24 Stunden mit PMA [100 nM] oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [500 µM] für vier Stunden stimuliert und für weitere 24

Stunden in FKS-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V-PE markiert und im FACS-Gerät die Anzahl apoptotischer Zellen [%] bestimmt. Die kontrollstimulierten Zellen wiesen in den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen 13% Apoptose und in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen 15% Apoptose auf (Abb. 5.32, EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken, EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken). Eine Stimulierung mit PMA resultierte bei den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen in 16% Apoptose und bei den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen in 20% Apoptose. Die Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte in den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen zu 24% Apoptose und in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen zu 36% Apoptose. Es ist zu erwähnen, dass es sich bei PMA in der angewandten Konzentration nicht wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um ein zelltoxisches Agens handelte.



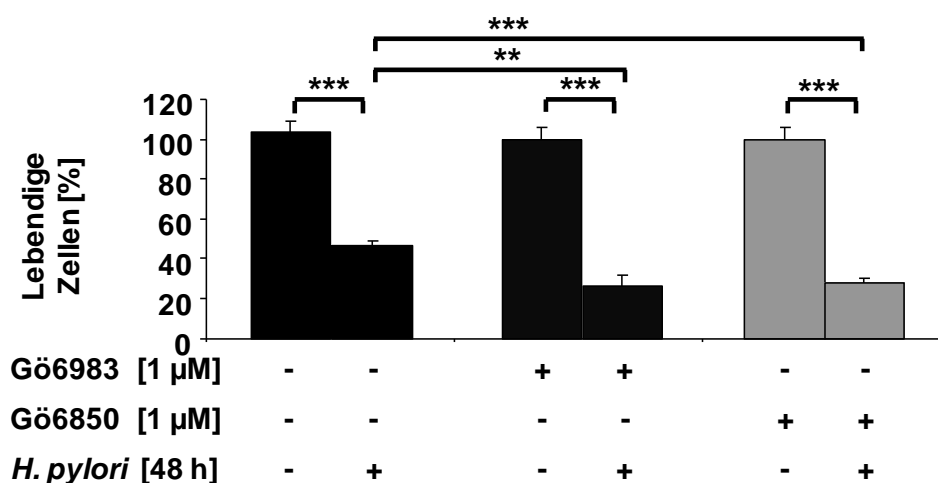
**Abbildung 5. 32: Graphische Darstellung der Annexin-V-PE Messung mittels FACS-Analyse nach Stimulierung pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PMA:** AGS Zellen wurden mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> (schwarze Balken) und pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> (graue Balken) transfiziert und für vier Stunden mit PMA 100 nM oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM stimuliert. Im Anschluss wurde das serumfreie Medium ausgetauscht und für weitere 24 Stunden inkubiert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (Apoptose [%]) wurde im FACS durch eine Annexin-PE Färbung bestimmt. Die Ergebnisse von Triplikaten von einem aus zwei unabhängigen Experimenten wurden in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05.

Mit diesem Experiment konnte durch Stimulierung pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierender AGS Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 36% Apoptose induziert werden und in pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierender AGS Zellen 24% Apoptose. Eine Stimulierung mit PMA resultiert kaum in einer Steigerung der Apoptose in beiden Transfektionsansätzen.

## 5.9 Eine Inhibierung von PKCs vermindert die Zellviabilität *H. pylori*-

### infizierter human epithelialer Adenocarcinoma Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Serin-/ Threoninkinase PKC als eine mögliche Kinase identifiziert werden, die c-Abl an Threonin<sup>735</sup> während einer sechsständigen *H. pylori*-Infektion phosphoryliert (Abschnitt 5.2). In einem nächsten Schritt sollte eruiert werden, ob eine Inhibierung von PKC während einer *H. pylori*-Infektion und die damit ausbleibende Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> zu einer Verminderung der Zahl lebendiger Zellen beiträgt (Abb. 5.33). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert, nach 24 Stunden unbehandelt belassen (-) oder mit den PKC-Inhibitoren Gö6983 [1 µM] oder Gö6850 [1 µM] für eine Stunde präinkubiert (Abb. 5.33, schwarze Balken (-), dunkelgraue Balken Gö6983, Gö6850 hellgraue Balken). Diese beiden PKC-Inhibitoren wurden für dieses Experiment ausgewählt, da mit ihnen die *H. pylori*-induzierte c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung effektiv unterbunden werden konnte. Die mit den Inhibitoren vorbehandelten AGS Zellen wurden für 48 Stunden kontroll- oder mit *H. pylori* mit MOI 100 infiziert und mittels Zellviabilitäts-Test die Zahl lebendiger Zellen bestimmt (Abb. 5.33).



**Abbildung 5.33: Graphische Darstellung des Zellviabilitäts-Tests nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen mit und ohne PKC-spezifischem Inhibitor:** pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierte AGS Zellen wurden eine Stunde vor Infektion nicht (schwarze Balken) oder mit den PKC Inhibitoren Gö6983 1µM (dunkelgraue Balken) und Gö6850 1 µM (hellgraue Balken) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen schein- ( - ) oder mit *H. pylori* MOI 100 für 48 Stunden infiziert. Der prozentuale Anteil der lebendigen Zellen (lebendige Zellen [%]) wurde mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt und mittels Mikrotiterplattenleser ausgewertet. Die Ergebnisse von Quadruplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05.

Die Infektion der Zellen mit *H. pylori* ohne PKC-Inhibitor resultierte in einer Verminderung auf 46% lebendiger Zellen (Abb. 5.33, schwarze Balken). AGS Zellen, die mit den PKC Inhibitoren präinkubiert wurden zeigten in den Gö6983-behandelten Zellen eine Verringerung

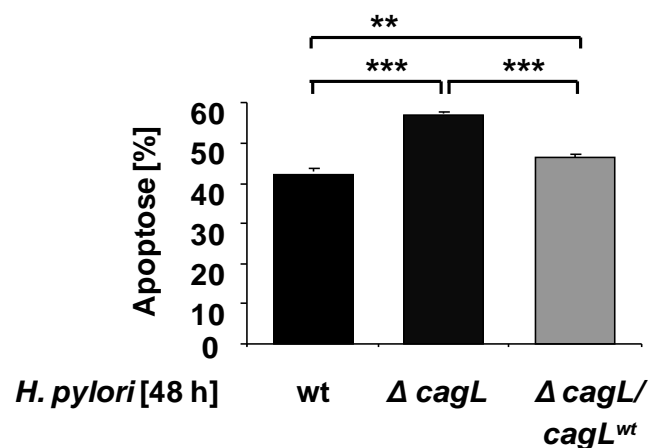
der Zahl lebendiger Zellen auf 27% und mit Gö6850 auf 28% lebendiger Zellen nach 48 Stunden *H. pylori*-Infektion (Abb. 5.33, Gö6983 dunkelgraue Balken, Gö6850 hellgraue Balken).

Durch eine Inhibierung von PKC in AGS Zellen mit Gö6983 und Gö6850 während einer 48-stündigen *H. pylori*-Infektion konnte eine Reduktion lebendiger Zellen um circa 20% gezeigt werden.

## 5.10 Bakterieller CagL vermindert die *H. pylori*-induzierte Apoptose in

### human epithelialen Adenocarcinoma Zellen

Nachdem ein Einfluss von PKC auf die Zahl lebender Zellen während einer *H. pylori*-Infektion bewiesen wurde, sollte in einem nächsten Schritt die Wirkung des bakteriellen Faktors CagL auf Apoptose während einer *H. pylori*-Infektion gezeigt werden (Abb. 5.34). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert und nach 24 Stunden mit *H. pylori*<sup>wt</sup>, einer *H. pylori*  $\Delta$  *cagL* Mutante ( $\Delta$  *cagL*) oder einer mit einer *H. pylori* *cagL*<sup>wt</sup> rekomplementierten  $\Delta$  *cagL* Mutante ( $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup>) mit MOI 100 für 48 Stunden infiziert (Abb. 5.34).

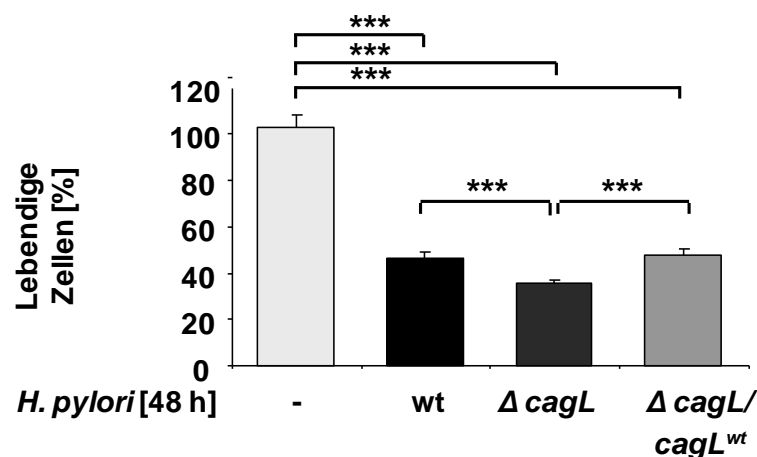


**Abbildung 5.34:** Graphische Darstellung der Annexin-V-PE Messung mittels FACS-Analyse nach 48-stündiger Infektion pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen mit *H. pylori*<sup>wt</sup> oder den *H. pylori*-isogenen Mutanten  $\Delta$  *cagL* und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup>: pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierte AGS Zellen wurden mit *H. pylori* wt oder den *H. pylori* isogenen Mutanten  $\Delta$  *cagL* und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> mit MOI 100 für 48 h infiziert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (Apoptose [%]) wurde im FACS durch eine Annexin-PE Färbung bestimmt. Die Ergebnisse von Triplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Die induzierte Apoptose [%] der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen wurde mittels Annexin-V-PE Färbung im FACS-Gerät bestimmt und in einem Graphen als Balkendiagramm

dargestellt. Die Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen resultierte nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion in 42% Apoptose (Abb. 5.34, *H. pylori*<sup>wt</sup> schwarzer Balken). Eine Infektion der AGS Zellen mit  $\Delta$  *cagL* führte zu 57% Apoptose (Abb. 5.34,  $\Delta$  *cagL* dunkelgrauer Balken). Eine *H. pylori*-Infektion der AGS Zellen mit  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> führte zu 46% Apoptose der infizierten Zellen (Abb. 5.34,  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> hellgrauer Balken).

Anhand dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass eine Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen mit dem *H. pylori*<sup>wt</sup> führte im Vergleich zu einer Infektion mit  $\Delta$  *cagL* zu einer Differenz von 15% Apoptose führte. Eine Infektion der Zellen mit *H. pylori*<sup>wt</sup> und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> wies lediglich eine Differenz von 4% Apoptose zwischen den beiden Infektionsansätzen auf.



**Abbildung 5.35: Graphische Darstellung des Zellviabilitäts-Tests nach 48-stündiger *H. pylori*-Infektion pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen mit *H. pylori*<sup>wt</sup> oder den *H. pylori*-isogenen Mutanten  $\Delta$  *cagL* und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup>:** pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierte AGS Zellen wurden nicht (-, weißer Balken) mit *H. pylori* wt (schwarzer Balken) oder den *H. pylori*-isogenen Mutanten  $\Delta$  *cagL* (dunkelgrauer Balken) und  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> (hellgrauer Balken) mit MOI 100 für 48 h infiziert. Der prozentuale Anteil der lebendigen Zellen (lebendige Zellen [%]) wurde mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt und mittels Mikrotiterplattenleser ausgewertet. Die Ergebnisse von Quadruplikaten von einem aus zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Dieser Effekt von bakteriellem CagL auf die Apoptose während eine *H. pylori*-Infektion sollte anhand eines Zellviabilitäts-Tests bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> transfiziert und nach 24 Stunden schein- (-), mit *H. pylori*<sup>wt</sup>,  $\Delta$  *cagL* oder  $\Delta$  *cagL/cagL*<sup>wt</sup> mit MOI 100 für 48 Stunden infiziert und mittels Zellviabilitäts-Test die Zahl lebendiger Zellen bestimmt (Abb. 5.35). Das Ergebnis wurde in einem Graphen als Balkendiagramm dargestellt. Eine Infektion der pSGT-exprimierenden AGS Zellen mit *H. pylori*<sup>wt</sup> führte zu einer Reduktion der lebendigen Zellen auf 47% (Abb. 5.35, (-) weißer Balken, *H. pylori*<sup>wt</sup> schwarzer Balken). Eine Infektion der AGS Zellen mit  $\Delta$  *cagL* führte zu



einer Reduktion lebendiger Zellen auf 36% (Abb. 5.35,  $\Delta$  *cagL* dunkelgrauer Balken).  $\Delta$  *CagL/cagL<sup>wt</sup>*-infizierte AGS Zellen wiesen 48% lebendige Zellen auf (Abb. 5.35, *cagL/cagL<sup>wt</sup>* hellgrauer Balken).

Anhand dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass eine 48-stündige Infektion pSGT-*c-Abl<sup>wt</sup>*-exprimierender AGS Zellen mit *H. pylori<sup>wt</sup>* und  $\Delta$  *cagL/cagL<sup>wt</sup>* zu einer ähnlich starken Reduktion lebendiger Zellen führt, wohingegen eine Infektion mit  $\Delta$  *cagL* 11% weniger lebendige AGS Zellen auswies.

Die Analyse mittels Annexin-V-PE Färbung und Zellviabilitäts-Test konnte eine ähnliche Tendenz erkennen lassen. In beiden Experimenten erzielte eine Infektion der AGS Zellen mit  $\Delta$  *cagL* eine stärkere Reduktion lebendiger Zellen im Vergleich zu *H. pylori<sup>wt</sup>*- und  $\Delta$  *cagL/cagL<sup>wt</sup>*-infizierten Zellen während einer 48-stündigen Infektion.

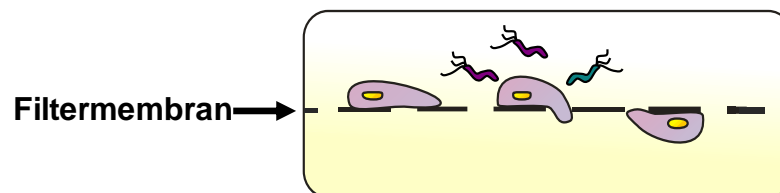
### 5.11 Eine Mutation an *c-Abl<sup>T735</sup>* zu Alanin<sup>735</sup> bewirkt eine Reduzierung der

#### *H. pylori*-induzierten Zellmigration in infizierten AGS Zellen

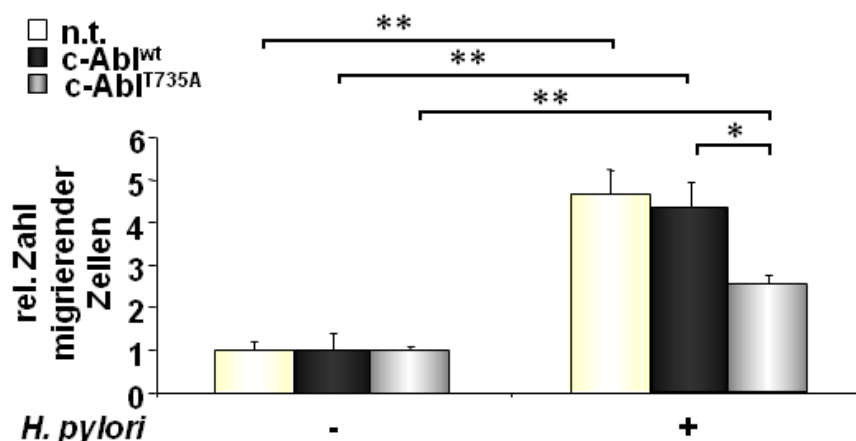
2007 wurde die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase *c-Abl* mit der Erhöhung der Zellmotilität in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen in Verbindung gebracht (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine *H. pylori*-Infektion gastraler Epithelzellen eine Aktivierung von *c-Abl* induziert, die in einer Tyrosinphosphorylierung des bakteriellen Faktors CagA an dessen EPIYA-Motiven resultiert. Die dadurch hervorgerufene Reorganisation des Zytoskeletts trägt maßgeblich zu einer Elongierung und erhöhten Motilität der infizierten Zellen bei (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). Ein möglicher Einfluss der Phosphorylierung an *c-Abl<sup>T735</sup>* auf die *H. pylori*-induzierte Elongierung und Motilität der infizierten Zellen sollte in einem weiteren Experiment eruiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Migrationsverhalten der stabil transfizierten Zelllinien AGS pNTAP-B-*c-Abl<sup>wt</sup>* und AGS pNTAP-B-*c-Abl<sup>T735A</sup>* während einer *H. pylori*-Infektion unter Verwendung eines Zellmigrations-Tests bestimmt. Die Zellen wurden in spezielle Kammern mit einer porösen Filtermembran ausgesät. Erfolgte die Migration der Zellen durch einen Stimulus, so bewirkte dies das Migrieren der Zellen von der Oberseite der Filtermembran durch die Poren auf die Unterseite der Membran (Abb. 5.36.A). Die AGS, AGS pNTAP-B-*c-Abl<sup>wt</sup>* und AGS pNTAP-B-*c-Abl<sup>T735A</sup>* Zellen wurden in die Zellmigrationskammern ausgesät und nach 24 Stunden in serumreduziertem Medium schein- (-) oder mit *H. pylori* mit MOI 50 für 24 Stunden infiziert (Abb. 5.36.B). Im Anschluss daran wurden die Zellen auf der Unterseite der Filtermembran fixiert, angefärbt und das Ergebnis der Auswertung in einem Graphen als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 5.36.B).

Eine Infektion der nicht-transfizierten AGS Zellen mit *H. pylori* resultierte im Vergleich zu den kontrollinfizierten in einer Steigerung der Zellmigration um das 4,7-fache (Abb. 5.36.B, (n.t.) gelbe Balken). Ein solcher Effekt von *H. pylori* auf die Migration infizierter Zellen wurde bereits in MCF-7 Zellen in dieser Arbeitsgruppe von Weydig beschrieben (Weydig Dissertation.,2009). Eine Infektion der AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen wies ein ähnliches Ergebnis auf. Die Infektion der Zellen mit *H. pylori* führte zu einer Steigerung der Zellmigration um das 4,3-fache im Vergleich zu den kontrollinfizierten Zellen (Abb. 5.36.B, pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> schwarze Balken). Eine Infektion der AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen resultierte in einer Erhöhung der Zellmigration um das 2,5-fache (Abb. 5.36.B, pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> graue Balken).

A.)



B.)



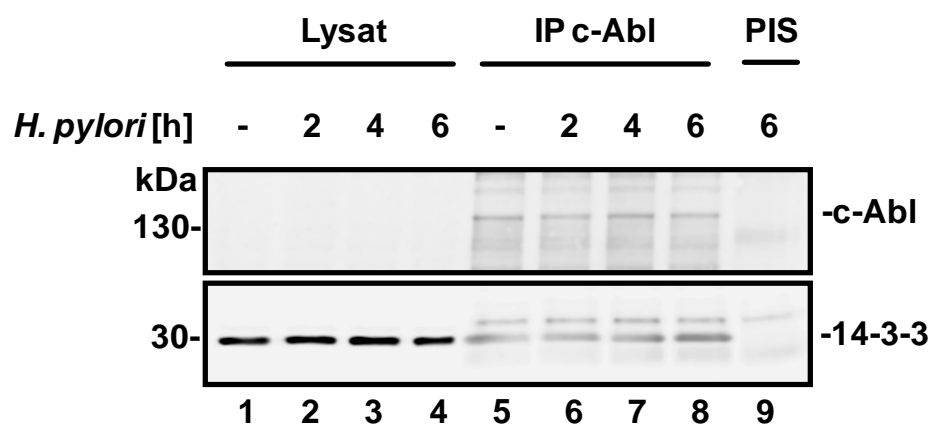
**Abbildung 5.36: Graphische Darstellung des Zellmigrations-Tests nach 24-stündiger *H. pylori*-Infektion pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>- oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierter gastraler Epithelzellen:** Die Migration *H. pylori*-infizierter AGS Zellen wurde mittels eines Zellmigrations-Tests überprüft. **A.)** Schematische Darstellung des Zellmigrations-Tests: AGS Zellen wurden in eine spezielle Kammer ausgesät. Der Boden dieser Kammer bestand aus einer Filtermembran mit einer Porengröße von 8 µm. Durch diese Poren wanderten die infizierten Zellen und wurden auf der Unterseite der Membran gezählt. **B.)** Zellen der Zelllinie AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> (c-Abl<sup>wt</sup>, schwarze Balken), AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> (c-Abl<sup>T735A</sup>, graue Balken), und nicht transfizierte AGS Zellen (n.t., gelbe Balken) wurden in poröse Kammern ausgesät und nach 24 Stunden schein- (-) oder mit *H. pylori* mit MOI 50 für 24 Stunden infiziert. Die migrierenden Zellen auf der Unterseite der Filtermembran wurden ausgezählt und in einem Graphen dargestellt. Die Ergebnisse von Triplikaten von einem aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und in einem Graphen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des T-Tests bestimmt: \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05.

Anhand der Ergebnisse des Zellmigrationsexperiments konnte gezeigt werden, dass AGS pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen während einer 24-stündigen *H. pylori* im Vergleich zu AGS oder

AGS pNTAP c-Abl<sup>wt</sup> Zellen ein signifikant geringeres Migrationsverhalten aufweisen. Die AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen wiesen ein ähnliches Migrationsverhalten wie die nicht transfizierten AGS Zellen 24 Stunden nach *H. pylori*-Infektion auf.

### 5.12 c-Abl interagiert mit 14-3-3 in *H. pylori*-infizierten Epithelzellen

Nachdem Unterschiede in AGS Zellen, die mit c-Abl<sup>wt</sup>- oder c-Abl<sup>T735A</sup> Plasmid-DNA transfiziert wurden, in Apoptose, Zellmigration und der Lokalisierung von c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion festgestellt werden konnten, sollte in einem abschließenden Schritt die Frage nach einer möglichen Interaktion mit dem Bindeprotein 14-3-3 beantwortet werden. Eine Interaktion von c-Abl<sup>wt</sup> und 14-3-3 basierend auf der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> konnte bereits in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulierten HeLa Zellen nachgewiesen werden (Nihira *et al.*, 2007). In einem ersten Experiment wurde eine mögliche Interaktion von endogenem c-Abl in Epithelzellen untersucht (Abb. 5.37). Zu diesem Zweck wurden Zellen mit *H. pylori* mit MOI 100 für die unten angegebenen Zeitpunkte infiziert. Eine Immunpräzipitation von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl Antikörper mit anschließender Analyse im Western Blot auf eine mögliche Interaktion mit dem Bindeprotein 14-3-3 (Abb. 5.37, Spur 5-8). Als Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation mit dem anti-c-Abl Antikörper wurde zudem Lysat infizierter Zellen mit dem Präimmunserum (PIS) der gleichen Tierspezies des Antikörpers (Maus) verwendet (Abb. 5.37, Spur 9).



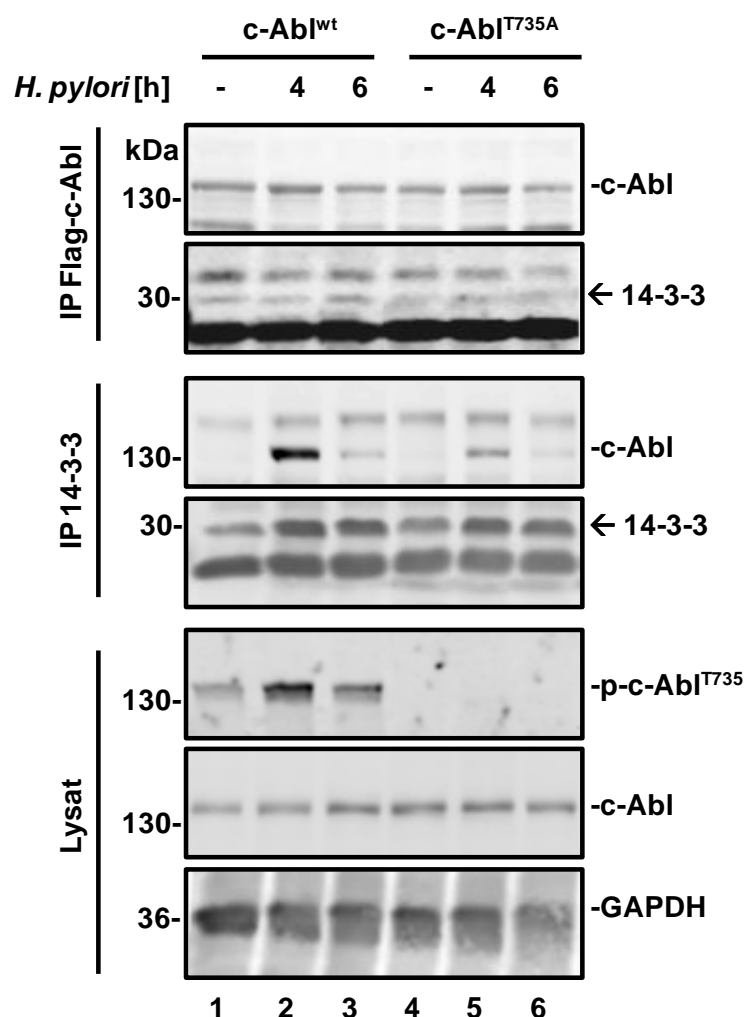
**Abbildung 5.37: Western Blot Analyse der Immunpräzipitation von c-Abl aus AGS Zellen während einer sechsständigen *H. pylori*-Infektion:** MCF-7 Zellen wurden schein- (Spur 1 und 5) oder mit *H. pylori* MOI 100 für zwei, vier und sechs Stunden infiziert (Spur 2 - 4 und 6 - 9). Im Anschluss wurde die Immunpräzipitation von c-Abl (Spur 5 - 6) mit einem spezifischen anti-c-Abl Antikörper (K12) durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Gesamtzelllysate (Lysate, Spur 1 - 4) aufgetragen. Als Nachweis der Spezifität der IP wurde in Spur 9 mit dem Lysat von *H. pylori* infizierten Zellen eine IP anstelle eines spezifischen anti-c-Abl Antikörpers mit Präimmunserum aus der gleichen Tierspezies des c-Abl Antikörpers verwendet (Maus). Der Nachweis von c-Abl erfolgte mit einem anti-c-Abl (24-11) Antikörper. Die Anwesenheit von 14-3-3 im Lysat und der IP wurde durch einen spezifischen anti-14-3-3 Antikörper nachgewiesen.

Zusätzlich wurde das Gesamt-Zelllysate der Zellen aufgetragen (Abb. 5.37, Spur 1-4). Aufgrund des geringen Gehaltes an c-Abl in den Zellen war das Protein in den Gesamt-Zelllysaten nicht detektierbar (Abb. 5.37, Spur 1-4). Nach einer Immunpräzipitation von c-Abl wurden deutliche Proteinbanden in Größe von c-Abl ca. 135 kDa im Western Blot dokumentiert (Abb. 5.37, Spur 5-8). Eine 135 kDa große Proteinbande wurde in der Präimmunserum-Kontrolle im Western Blot nicht beobachtet (Abb. 5.37, Spur 9). Eine Inkubation des Western Blots mit einem anti-14-3-3 Antikörper wies eine Proteinbande in der Größe von 14-3-3 bei ca. 32 kDa auf (Abb. 5.37, Spur 5-8). Während der sechsstündigen *H. pylori*-Infektion wurde eine Intensivierung des 14-3-3-Signals im Western Blot dokumentiert (Abb. 5.37, Spur 5-7). In der Präimmunserum-Kontrolle wurde keine Proteinbande in der Größe von 32 kDa mit dem anti-14-3-3 Antikörper im Western Blot dokumentiert (Abb. 5.37, Spur 9).

Zusammenfassend konnte anhand der Ko-Immunpräzipitation von 14-3-3 durch c-Abl während einer sechsstündigen *H. pylori*-Infektion von AGS Zellen eine Intensivierung der Interaktion von endogenem c-Abl und 14-3-3 gezeigt werden.

In einer weiteren Ko-Immunpräzipitation sollte herausgefunden werden, inwieweit sich exogenes c-Abl<sup>wt</sup> und c-Abl<sup>T735A</sup> in ihrem Bindungsverhalten zu 14-3-3 während einer *H. pylori*-Infektion unterscheiden (Abb. 5.38). AGS Zellen wurden mit pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup> oder pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup> transient transfiziert und kontroll- (-) oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für vier und sechs Stunden infiziert. Die Immunpräzipitation des exogenen c-Abl erfolgte über dessen Flag-Markierung mit einem anti-Flag Antikörper. Die Immunpräzipitation von 14-3-3 erfolgte mit einem anti-14-3-3 Antikörper. Die Immunpräzipitation wurde mittels Western Blot analysiert. Eine Immunpräzipitation von Flag-c-Abl konnte in jedem Ansatz verzeichnet werden (Abb. 5.38, IP Flag-c-Abl, Spur 1 – 6, c-Abl). In den pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten AGS Zellen wurde zudem eine Proteinbande in der Größe von 14-3-3 von ca. 32 kDa mit einem anti-14-3-3 Antikörper nachgewiesen (Abb. 5.38, IP Flag-c-Abl, pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup> Spur 1-3, c-Abl, 14-3-3). Es fiel jedoch auf, dass die kontroll- (-) und die vier Stunden *H. pylori*-infizierten Zellen eine ähnlich schwache Proteinbande bei 32 kDa mit dem anti-14-3-3 Antikörper aufwiesen. Eine sechsstündige *H. pylori*-Infektion zeigte eine leichte Intensivierung dieser Proteinbande im Western Blot (Abb. 5.38, IP Flag-c-Abl, pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup> Spur 1-3, 14-3-3). Eine Infektion der pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierten AGS Zellen führte zu keiner klar definierbaren Proteinbande in der Größe 14-3-3 von 32 kDa im Western Blot (Abb. 5.38, IP Flag-c-Abl, pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup> Spur 4-6, 14-3-3). Neben der Ko-Immunpräzipitation von 14-3-3 durch c-Abl wurde eine Co-Immunpräzipitation von c-Abl über 14-3-3 durchgeführt und im Western Blot analysiert (Abb. 5.38, IP 14-3-3, Spur 1-6, c-Abl). Eine Immunpräzipitation von 14-3-3 wurde sowohl in den pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>- als auch in den

pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen erfolgreich durchgeführt (Abb. 5.38, IP 14-3-3, pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>, pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup> Spur 1-6, 14-3-3). In beiden Transfektionsansätzen wiesen die AGS Zellen nach vier und sechs Stunden *H. pylori*-Infektion im Vergleich zu den kontrollinfizierten Zellen eine Intensivierung der 14-3-3 Proteinbande im Western Blot auf.



**Abbildung 5.38: Western Blot Analyse der Immunpräzipitation von c-Abl und 14-3-3 aus Flag-c-Abl<sup>wt</sup>- oder Flag-c-Abl<sup>T735A</sup>-transfizierten AGS Zellen während einer sechsständigen *H. pylori*-Infektion:** AGS Zellen wurden mit Flag-c-Abl<sup>wt</sup> oder Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> für 24 Stunden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen schein- (Spur 1 und 4) oder mit *H. pylori* MOI 100 für vier und sechs Stunden infiziert (Spur 2 – 3 und 5 – 6). Im Anschluss wurde die Immunpräzipitation von Flag-c-Abl (IP Flag-c-Abl) mit einem spezifischen anti-Flag Antikörper oder von 14-3-3 (IP 14-3-3) mit einem spezifischen anti-14-3-3 Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Gesamt-Zelllysate (Lysate) aufgetragen. Der Nachweis von p-c-Abl<sup>T735</sup> wurde im Western Blot detektiert. Die Anwesenheit von Flag-c-Abl erfolgte mit einem anti-Flag Antikörper (c-Abl), die von 14-3-3 durch einen spezifischen anti-14-3-3 Antikörper. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Eine Analyse der Immunpräzipitation von 14-3-3 im Western Blot mit einem anti-Flag-Antikörper zeigte einen Unterschied zwischen pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>- und pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup>-

exprimierenden AGS Zellen. Die Kontrollinfektion der pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen wies kein c-Abl auf. Eine vierstündige *H. pylori*-Infektion der pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen resultierte in einer deutlichen Proteinbande in der Größe von Flag-markiertem c-Abl von ca. 135 kDa (Abb. 5.38, IP 14-3-3, pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup> Spur 1-2, c-Abl). Sechs Stunden nach Infektion mit *H. pylori* wurde eine schwächere Proteinbande in den pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen im Western Blot dokumentiert (Abb. 5.38, IP 14-3-3, pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup> Spur 3, c-Abl). Die Kontrollinfektion der pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen wies kein c-Abl auf. Vier Stunden nach *H. pylori*-Infektion der pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen wurde nach Immunpräzipitation von 14-3-3 auch in diesem Ansatz Flag-markiertes c-Abl im Western Blot nachgewiesen. Die Intensität der Proteinbande lag zwischen der der vier- und sechsstündigen *H. pylori*-Infektion der pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen (Abb. 5.38, IP 14-3-3, pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup> Spur 5, c-Abl). Sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion zeigte die 135 kDa große Proteinbande eine Intensität zwischen der der vier Stunden *H. pylori*-infizierten pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen und den kontrollinfizierten AGS Zellen (Abb. 5.38, IP 14-3-3, pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup> Spur 6, c-Abl). Eine Analyse der Gesamt-Zelllysate im Western Blot zeigte eine basale Phosphorylierung von c-Abl<sup>T735</sup> in den kontrollinfizierten pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen. Eine vierstündige *H. pylori*-Infektion der pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen bewirkte eine Intensivierung der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>. Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> verlor sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion wieder an Intensität, befand sich jedoch immer noch über der kontrollinfizierten pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen. In den Gesamt-Zelllysaten der pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen wurde zu keiner Zeit eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> detektiert (Abb. 5.38, Gesamt-Zelllysate, Spur 1-6, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Die pcDNA3.1-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen wiesen in den Gesamt-Zelllysaten der kontroll- und vier Stunden *H. pylori*-infizierten Zellen einen etwas geringeren Gesamtproteingehalt an c-Abl auf im Vergleich zu den übrigen Gesamt-Zelllysaten (Abb. 5.38, Gesamt-Zelllysate, Spur 1-6, c-Abl). GAPDH wurde in allen Ansätzen der Gesamt-Zelllysate gleichermaßen im Western Blot dokumentiert (Abb. 5.38, Gesamt-Zelllysate, Spur 1-6, GAPDH).

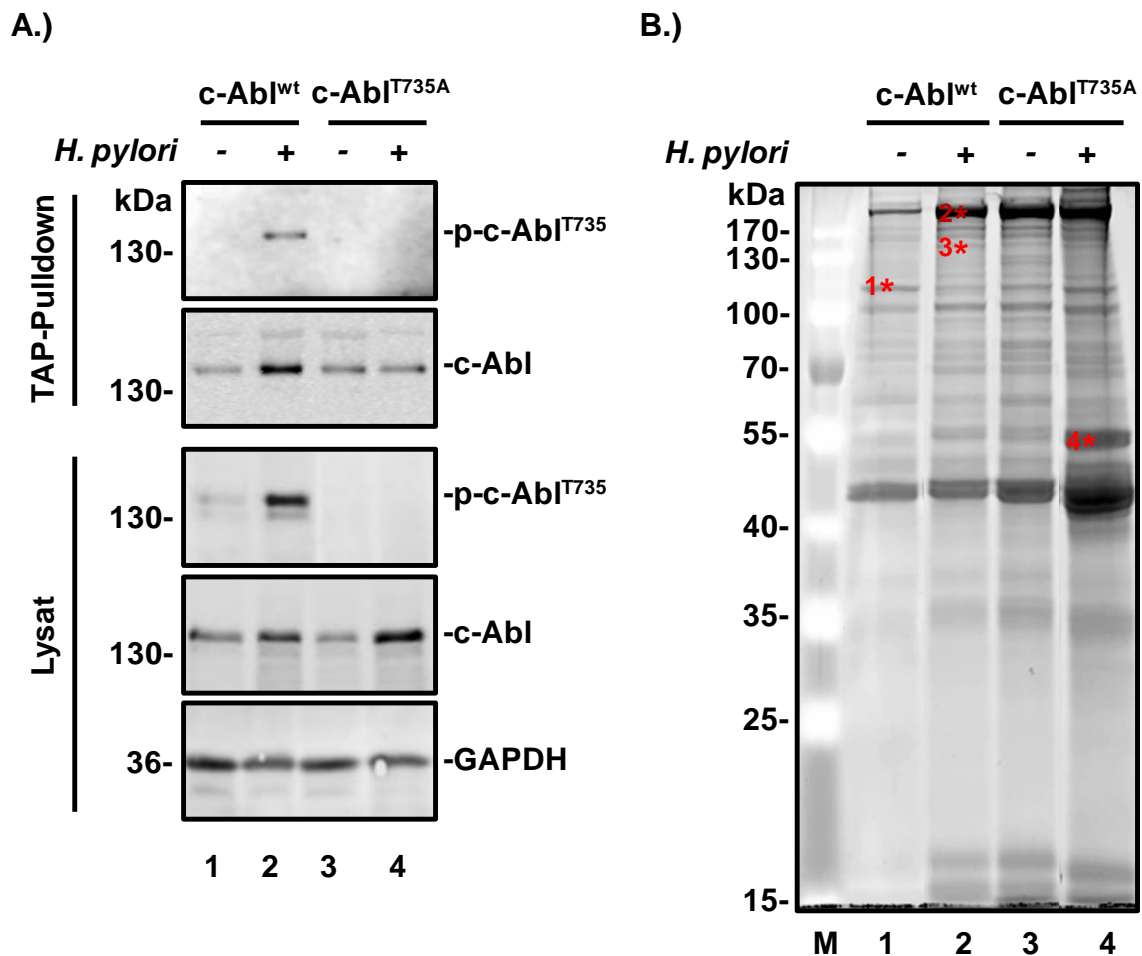
Anhand dieses Versuchs konnte eine Ko-Immunpräzipitation von 14-3-3 durch Flag-markiertes c-Abl und von Flag-markiertem c-Abl durch 14-3-3 gezeigt werden. Eine Präzipitation von Flag-c-Abl<sup>wt</sup> führte zu einer Ko-Immunpräzipitation von 14-3-3 mit der intensivsten 14-3-3 Proteinbande im Western Blot sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion. Eine Präzipitation von Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> führte zu keiner Ko-Immunpräzipitation von 14-3-3. Eine Ko-Immunpräzipitation von Flag-c-Abl<sup>wt</sup> durch 14-3-3 zeigte die stärkste Proteinbandenintensität in der Größe von Flag-c-Abl<sup>wt</sup> vier Stunden nach *H. pylori*-Infektion. Eine Co-Immunpräzipitation von Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> durch 14-3-3 wies ebenfalls eine

Proteinbande in der Größe von Flag-markiertem c-Abl vier Stunden nach *H. pylori*-Infektion auf, jedoch war diese deutlich schwächer als die des Flag-c-Abl<sup>wt</sup>. In den Gesamt-Zelllysaten der pcDNA3.1-transfizierten AGS Zellen wurde nach vierstündiger *H. pylori*-Infektion die stärkste Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> bei gleichbleibendem c-Abl Gesamtproteingehalt dokumentiert.

### 5.13 Identifizierung von c-Abl Bindungspartnern mittels Tandem- Affinitäts-

#### Aufreinigung

Um eine Aussage über weitere mögliche c-Abl Bindungspartner in Abhängigkeit von einer Phosphorylierung c-Abl<sup>T735</sup> in *H. pylori*-infizierten Epithelzellen treffen zu können, wurde eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung durchgeführt (Abb. 5.39, TAP-Pulldown). Zu diesem Zweck wurden AGS Zellen mit pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> transient transfiziert und kontroll- (-) oder mit *H. pylori* mit MOI 100 für sechs Stunden infiziert. Mit den durch die TAP-Aufreinigung gewonnen Proben wurden ein 10%iges SDS-Gel für eine massenspektrometrische Analyse und ein weiteres zum Anfertigen eines Western Blots angefertigt (Abb. 5.39). Neben der TAP-Aufreinigung wurden im Western Blot zusätzlich die Gesamt-Zelllysate aufgetragen. Die Analyse der Tap-Aufreinigung im Western Blots zeigte sechs Stunden *H. pylori*-Infektion in den pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten AGS Zellen eine deutliche Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (Abb. 5.39.A, TAP-Pulldown, pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Spur 2, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Weder in den kontrollinfizierten pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen noch in den beiden Ansätzen der pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen wurde eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> detektiert (Abb. 5.39.A, TAP-Pulldown, Spur 1, 3-4, p-c-Abl<sup>T735</sup>). Der Nachweis von TAP-markiertem c-Abl in den jeweiligen Aufreinigungen zeigte ein etwas heterogenes Bild. In der TAP-Aufreinigung der *H. pylori*-infizierten pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen wurde mehr c-Abl präzipitiert als in den übrigen drei Ansätzen (Abb. 5.39.A, TAP-Pulldown, Spur 1-4, c-Abl). Die Western Blot Analyse der Gesamt-Zelllysate der pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen mit einem anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper zeigte ebenfalls eine Phosphorylierung c-Abl<sup>T735</sup> nach *H. pylori*-Infektion (Abb. 5.39.A, Lysate, Spur 2, p- c-Abl<sup>T735</sup>). In Bezug auf den c-Abl Gesamtproteingehalt wurde sowohl in den pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>- als auch den pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen nach *H. pylori*-Infektion eine Zunahme an c-Abl im Vergleich zu den Kontrol-infizierten Zellen beobachtet (Abb. 5.39.A, Lysate, Spur 2 und 4, c-Abl).



**Abbildung 5.39: Identifizierung von c-Abl Bindungspartnern in *H. pylori*-infizierten Epithelzellen mittels TAP-Affinitäts-Aufreinigung.** AGS Zellen wurden mit pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> für 24 Stunden transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen schein- (Spur 1 und 3) oder mit *H. pylori* MOI 100 für sechs Stunden infiziert (Spur 2 und 4). Im Anschluss wurde der TAP-Pulldown mit Streptavidin- und Calmodulinbindungsprotein überzogenen Sepharosekügelchen durchgeführt und ein Western Blot erstellt. **A.)** Im Western Blot wurden die Proben auf die Induktion von p-c-Abl<sup>T735</sup> mit einem anti-p-c-Abl<sup>T735</sup> Antikörper untersucht. Der Nachweis von c-Abl erfolgte über einen anti-c-Abl Antikörper. Als Kontrolle wurden die Gesamtzelllysate (Lysate) aufgetragen. Auch hier wurden p-c-Abl<sup>T735</sup> und c-Abl durch die spezifischen Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. **B.)** Das 10%ige SDS-Gel wurde zum Visualisieren mit Sypro Ruby gefärbt und unter UV-Licht die Proteinbanden sichtbar gemacht und dokumentiert. Zur Größenbestimmung der Proteinbanden wurde ein Proteinmarker (M) aufgetragen. Die markierten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometer von Dr. Andreas Reuter identifiziert. Die TAP-Affinitäts-Aufreinigung wurde auf Grund der zeitlichen Limitierung nur einmal durchgeführt und sollte einen Ausblick auf mögliche c-Abl Bindungspartner geben.

In einem nächsten Schritt wurden interessante Proteinbanden aus dem Sypro Ruby gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch von Herrn Dr. Andreas Reuter am Paul-Ehrlich Institut in Langen untersucht (Abb. 5.39.B, rote Sternchen mit Zahlen). Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse wurde in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 5.1).



Unter den identifizierten Proteinen befand sich das 105 kDa große  $\alpha$ -Actinin 4 (Tab. 5.1, Abb. 5.39.B, Spur 1), welches in Stressfasern angereichert ist und dort Aktinfilamente zu lockeren Bündeln quervernetzt (Alberts, 2004).  $\alpha$ -Actinin 4 wurde bereits als ein Interaktionspartner von c-Abl nachgewiesen (Hoy, B. Diplomarbeit, 2008). Bezüglich der Intensität der  $\alpha$ -Actinin 4 Proteinbande in dem SDS-Gel zeigte sich weder zwischen den kontroll- noch *H. pylori*-infizierten pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>- und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen ein signifikanter Unterschied (Abb. 5.39.B, Spur 1-4). Desweiteren wurde Myosin 9 in den pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-transfizierten *H. pylori*-infizierten Zellen identifiziert (Tab. 5.1, Abb. 5.39.B, Spur 2). Myosin 9 ist ein zelluläres Motorprotein, das an der Veränderung der Zellmorphologie beteiligt ist. Dies basiert unter anderem auf einer Interaktion mit Aktin.

**Tabelle 5. 1. Identifizierte Proteine**

Bande	Akzessionsnr.	Protein	Score	Sequenzabdeckung [%]
1	O43707	$\alpha$ -Actinin 4	382	9,3
2	P35579	Myosin 9	1101	26,6
3	-	n.d.		
4	P68363	Tubulin $\alpha$ 1B chain	3901	24,4
	P07437	Tubulin $\beta$ chain	481	23,9

**Tabelle 5.1: Identifizierung c-Abl Bindungspartnern mittels Massenspektrometrie.** In der Tabelle sind die aus dem SDS-Gel in Abb. 5.39. markierten Proteinbanden Dr. Andreas Reuter identifiziert worden. Die Proteinidentifikationsnummer (Akzessionsnr.), Proteinname, die Score und die Sequenzabdeckung durch die massenspektrometrisch identifizierten Peptide mit der Wertigkeit dargestellt. Bei den identifizierten Proteinen des TAP-Pulldowns handelt es sich um menschliche Proteine.

Verglich man die TAP-Aufreinigung der kontroll- und *H. pylori*-infizierten pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden AGS Zellen, so war in der kontrollinfizierten Zellen eine weitaus schwächere Proteinbande in Größe von 227 kDa auszumachen als in den *H. pylori*-infizierten Zellen (Abb. 5.39.B, Spur 2). Zudem wiesen die pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen ein gleichmäßig starkes Signal in kontroll- und *H. pylori*-infizierten Zellen auf (Abb. 5.39.B, Spur 3-4). Es ist jedoch auch zu erwähnen, dass Myosin 9 an Calmodulin bindet und die TAP-Aufreinigung auf der Bindung von Calmodulin an die mit Calmodulinbindepotein überzogene Sepharose basiert (<http://www.uniprot.org>, 2012). Um eine unspezifische Bindung von Myosin an die Sepharose auszuschließen, müsste in einem weiteren Experiment eruiert

werden. Hierbei sollte als Negativkontrolle das jeweilige Lysat nicht transfizierter Zellen bei der TAP-Aufreinigung mitgeführt werden.

Neben  $\alpha$ -Actinin 4 und Myosin 9 wurden Tubulin  $\alpha$  und  $\beta$  (beide 50 kDa groß) als Interaktionspartner isoliert (Tab. 5.1, Abb. 5.39.B, Spur 4). Tubulin ist die Proteinuntereinheit der Mikrotubuli, die eine der drei Hauptklassen von Filamenten des Zytoskeletts bilden (Alberts, 2004). Betrachtet man die Intensität dieser Proteinbande in allen vier Versuchsansätzen, so war das intensivste Signal im SDS-Gel in den *H. pylori*-infizierten Zellen der pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen zu finden (Abb. 5.39.B, Spur 4). Die kontrollinfizierten pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> Zellen wiesen eine deutlich schwächere Proteinbande auf, die in ihrer Intensität der der *H. pylori*-infizierten pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> Zellen gleich (Tab. 5.1, Abb. 5.39.B, Spur 2-3). Im Gegensatz dazu wurde in den kontrollinfizierten pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen kein Signal dieser Größe im SDS-Gel ausgemacht (Tab. 5.1, Abb. 5.39.B, Spur 1).

Mit der Tandem-Affinitäts Aufreinigung konnten die oben genannten Proteine als Interaktionspartner von TAP-c-Abl<sup>wt</sup> und TAP-c-Abl<sup>T735A</sup> identifiziert werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich weitestgehend um Bestandteile des zellulären Zytoskeletts. Inwieweit es sich um eine spezifische Bindung an c-Abl handelt, müsste in weiteren Experimenten genauer eruiert werden. Vielmehr sollte dieser Versuch einen ersten Hinweis auf weitere mögliche Interaktionspartner von c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion und deren Abhängigkeit von einer *H. pylori*-induzierten Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> geben. Um eindeutige Unterschiede zwischen den Bindungspartnern von TAP-c-Abl<sup>wt</sup> und TAP-c-Abl<sup>T735A</sup> machen zu können, bedarf es jedoch weiterer intensiver Untersuchungen.

## 6. Diskussion

Maligne Neoplasien, gemeinhin als "Krebs" bezeichnet, gehören zu den häufigsten Krankheiten unserer Zeit. Diese Krankheiten sind von einer unkontrollierten Vermehrung entarteter Zellen geprägt, der meist eine Deregulierung von Signalwegen in diesen Zellen zu Grunde liegt. Magenkrebs stellt die vierthäufigste Krebserkrankung auf der Welt dar und ist daher ein Thema intensiver Forschung (Parkin *et al.*, 2001). Die Entstehung von Magenkrebs wird durch genetische Prädisposition und durch Lebensumstände begünstigt, ist jedoch auch auf die Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen zurückzuführen (Blaser und Atherton, 2004). *H. pylori* wurde auf Grund seiner kanzerogenen Eigenschaften 1994 von der Weltgesundheitsbehörde (*WHO-World Health Organization*) als Klasse 1 Karzinogen deklariert (*International Agency for Research on Cancer*, 1994). Die Pathogenese einer *H. pylori*-Infektion korreliert eng mit dem Vorhandensein der Pathogenitätsinsel *cagPAI*, die unter anderem für ein Typ IV Sekretionssystem (T4SS) und den Pathogenitätsfaktor CagA kodiert (Blaser *et al.*, 1995; Backert *et al.*, 2000; Viala *et al.*, 2004). Über das T4SS gelangen CagA und Peptidoglykane in das Zytoplasma der infizierten Wirtszellen, was zu einer Tyrosinphosphorylierung von CagA durch die Tyrosinkinasen Src und c-Abl führt. Dies resultiert in der Deregulierung wichtiger zellulärer Signalkaskaden und stellt eine Basis für die Entartung gastraler Epithelzellen dar (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007; Higashi *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). C-Abl fungiert in der *H. pylori*-induzierten Zellmigration als ein zentrales Schalterprotein, ohne dessen Aktivität die Elongation und Motilität der infizierten Zellen längerfristig ausbleiben würde (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). Neben seiner Bedeutung in *H. pylori*-induzierter Zellmigration besteht aufgrund seiner vielseitigen Funktion in Apoptose, Migration, Proliferation und Differenzierung zudem die Annahme, dass c-Abl auch in diesen *H. pylori*-induzierten Prozessen von zentraler Bedeutung sein könnte. Es stellt bereits als Bcr-Abl Fusionsprotein ein wichtiges Protoonkogen in CML (*chronic myelogenous leukemia*) und ALL (*acute lymphocytic leukemia*) dar. Seine onkogene Wirkung basiert dabei auf der konstitutiven Aktivität von c-Abl im Zytoplasma der betroffenen Zellen (Raitano *et al.*, 1997; Daley *et al.*, 1990). In *H. pylori*-infizierten Zellen ist das Protein im Zytoplasma lokalisiert, was eine c-Abl-vermittelte Zellmigration zur Folge hat und möglicherweise auch anti-apoptotische Prozesse in den infizierten Zellen begünstigt (Poppe *et al.*, 2007; S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Ein Grund für die vermehrte zytoplasmatische Lokalisierung von c-Abl kann eine konstitutive Phosphorylierung an Threonin<sup>735</sup> (c-Abl<sup>T735</sup>) durch die zelluläre dual-spezifische Serin/Threonin-Tyrosin-Proteinkinase TTK sein. Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> ermöglicht eine Bindung von c-Abl an zytoplasmatischen Bindeproteinen wie 14-3-3 (Yoshida *et al.*, 2005). Eine solche Bindung von c-Abl<sup>T735</sup> und 14-3-3 fördert die Lokalisierung

von c-Abl im Zytoplasma der Zellen und die anti-apoptotische Wirkung von c-Abl in Zellen als Reaktion auf oxidativen Stress (Nihira *et al.*, 2008). In vorangegangenen Arbeiten konnte eine *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (p-c-Abl<sup>T735</sup>) gezeigt werden. Für die Induktion dieser *H. pylori*-vermittelten T<sup>735</sup>-Phosphorylierung ist das Vorhandensein einer funktionellen *cagPAI* zwingend notwendig, jedoch nicht die des Pathogenitätsfaktors CagA (M. Poppe Dissertation, 2008; S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen Einfluss von p-c-Abl<sup>T735</sup> auf anti-apoptotische Prozesse während einer *H. pylori*-Infektion in epithelialen Zellen zu untersuchen. Desweiteren sollte die für die Phosphorylierung verantwortliche zelluläre Threoninkinase und die darin involvierten bakteriellen Faktoren von *H. pylori* identifiziert werden.

### **6.1 Die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> ist unabhängig von der Akkumulierung von c-Abl in infizierten gastralen Epithelzellen**

Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass eine Infektion der epithelialen Brustkrebs Zelllinie MCF-7 und der gastralen Epithelzellen MKN-28 mit *H. pylori* zu einer Phosphorylierung von exogenem c-Abl an Threonin<sup>735</sup> (T<sup>735</sup>) führt (M. Poppe Dissertation, 2008; S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch in diesen Zelllinien keine Phosphorylierung an endogenem c-Abl<sup>T735</sup> nachgewiesen werden. Eine transiente Phosphorylierung an endogenem c-Abl<sup>T735</sup> wurde bereits in HeLa Zervixkarzinom-Zellen beschrieben (Yoshida *et al.*, 2005; Nihira *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit AGS Zellen eine weitere gastrale Epithel-Zelllinie hinzugezogen, in der c-Abl eine zentrale Rolle in der *H. pylori*-induzierten Zellmotilität spielt. Diese basiert vornehmlich auf der Tyrosinphosphorylierung von bakteriellem CagA durch Src und c-Abl sowie den daraus resultierenden zellmorphologischen Veränderungen (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). In diesen AGS Zellen wurde in einer anfänglichen *H. pylori*-Infektionskinetik eine T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an exogenem pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> aufgezeigt, dessen Maximum zwischen sechs und acht Stunden nach *H. pylori*-Infektion lag (Ergebnisse, Abb. 5.2 und 5.3). Zeitgleich wurde die Spezifität dieser Phosphorylierung unter Verwendung von exogenem pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup> in einer *H. pylori*-Infektionskinetik bestätigt. Diese c-Abl<sup>T735A</sup> Mutante ist aufgrund des Aminosäureaustausches von T<sup>735</sup> zu Alanin<sup>735</sup> (c-Abl<sup>T735A</sup>) phosphorylierungsresistent (Yoshida *et al.*, 2005). In den *H. pylori*-infizierten AGS Zellen, die pSGT-c-Abl exprimierten, wurde neben der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> eine Akkumulierung von c-Abl beobachtet, die unabhängig von der Phosphorylierung ist. Eine vergleichbare Zunahme sowohl an endogenem als auch an exogenem c-Abl wurde bereits in vorangegangenen Experimenten dokumentiert (M. Poppe, 2008 Dissertation; S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Die vermehrte Transkription von c-Abl RNA ist jedoch auszuschließen (Poppe *et al.*, 2007). Es ist anzunehmen, dass es sich um eine Akkumulierung des Proteins

handelt, basierend auf einer veränderten proteasomalen Aktivität. Eine Quantifizierung des p-c-Abl<sup>T735</sup>- und des c-Abl-Signals im Western Blot zeigte eine deutliche Divergenz in der Akkumulierung von c-Abl und der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in AGS Zellen (Ergebnisse, Abb. 5.3). Das Maximum der Phosphorylierung lag sechs Stunden nach *H. pylori*-Infektion bei dem 14-fachen Wert, wohingegen der maximale Wert der c-Abl-Akkumulierung das 2,5-fache betrug. Eine vergleichbare Intensität der c-Abl-Akkumulierung wurde auch in pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden AGS Zellen beobachtet. Dies lässt auf eine Unabhängigkeit der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung von der Akkumulierung von c-Abl vermuten. Jedoch könnte eine mögliche T<sup>735</sup>-Phosphorylierung von endogenem c-Abl zu einer Akkumulierung von pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup> führen. Eine Dimerisierung von endogenem c-Abl und dem exogenen c-Abl<sup>T735A</sup>-Protein könnte in einer Akkumulierung des c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteins während einer *H. pylori*-Infektion der AGS Zellen resultieren (Fan *et al.*, 2003). Dieser Theorie widerspricht jedoch die unterschiedliche Lokalisierung des exogenen c-Abl<sup>wt</sup>- und des phosphorylierungsresistenten c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteins in *H. pylori*-infizierten AGS Zellen (Kapitel 6.2).

*H. pylori*-Infektionskinetiken in der Brustkrebs Zelllinie MCF-7 und den gastralen Epithelzellen MKN-28 wiesen sowohl eine Akkumulierung als auch eine T<sup>735</sup>-Phosphorylierung von exogenem pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> in den Zellen auf (Ergebnisse, Abb. 5.4-5.5). Das Maximum der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung lag in MCF-7 Zellen nach sechs Stunden bei dem 12-fachen und die Akkumulierung bei dem 2,8-fachen. In MKN-28 Zellen hingegen wurde eine maximale T<sup>735</sup>-Phosphorylierung sechzehn Stunden nach *H. pylori*-Infektion gemessen. Diese betrug das 5,7-fache, während die Akkumulierung von c-Abl das 2-fache betrug. Anhand der Experimente mit exogenem pSGT-c-Abl konnte ein Zeitfenster der *H. pylori*-Infektion in den jeweiligen Zelllinien definiert werden, in dem eine maximale T<sup>735</sup>-Phosphorylierung von c-Abl stattfindet. Dieses lag in AGS und MCF-7 Zellen bei sechs Stunden und in MKN-28 Zellen bei sechzehn Stunden nach *H. pylori*-Infektion. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden die gastralen Zelllinien AGS und MKN-28 bezüglich einer Phosphorylierung von endogenem c-Abl untersucht. Vier Stunden nach *H. pylori*-Infektion wurde in AGS Zellen ein p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signal im Western Blot detektiert. Auch in MKN-28 Zellen wurde eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> mittels Immunpräzipitation nach sechzehnstündiger *H. pylori*-Infektion nachgewiesen. Anhand dieser Ergebnisse konnte erstmals eine *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung von endogenem c-Abl an T<sup>735</sup> gezeigt werden.

Die Unterschiede in den Phosphorylierungszeitpunkten zwischen den einzelnen Zelllinien basieren vermutlich auf einer differierenden zeitlichen Aktivität der gesuchten Threoninkinase. Eine mögliche Ursache könnte in dem deutlich dichteren Zellverband der MKN-28 Zellen zu finden sein, was die Zugänglichkeit der Zellen für das Bakterium zusätzlich erschwert und somit eine Verzögerung der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>

bewirken könnte. Unterstrichen wird diese Annahme durch eine deutliche Verzögerung der CagA-Tyrosinphosphorylierung in MKN-28 Zellen im Vergleich zu *H. pylori*-infizierten AGS Zellen (Schneider *et al.*, 2011).

## 6.2 Phosphoryliertes c-Abl<sup>T735</sup> lokalisiert vornehmlich im Zytoplasma *H. pylori*-infizierter Epithelzellen

Die ubiquitär exprimierte Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Abl ist in einer Reihe von zellulären Kompartimenten lokalisiert. Neben Zytoplasma und Zellkern wurde c-Abl in dem endoplasmatischen Retikulum (ER), den Mitochondrien und dem Zellkortex von Mammaliazellen gefunden (Ito *et al.*, 2001; van Etten *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1996; Koleske *et al.*, 1998). In Abhängigkeit von Zelltyp, zellulärem Stimulus und der Lokalisierung von c-Abl in der Zelle resultiert dessen Aktivierung in einer Vielzahl von zellulären Funktionen. Diese beinhalten die Regulierung von Zellproliferation und Apoptose, Kontrolle des Aktin-Zytoskeletts, Zellmorphologie und -migration (Pendergast, 2002). Der kontrollierte Wechsel von c-Abl zwischen Zellkern und Zytoplasma ist essentiell für die Funktion dieses Proteins in der Zelle. Die onkogene Wirkung von Bcr-Abl in Zellen von Patienten mit ALL oder CML basiert maßgeblich auf dessen gesteigerter Aktivität im Zytoplasma der Zellen (Raitano *et al.*, 1997; Daley *et al.*, 1990 Wetzler *et al.*, 1993). Eine Infektion gastraler Epithelzellen mit *H. pylori* hat eine Modifikation der Lokalisierung von c-Abl in den infizierten Zellen zur Folge. In MCF-7 Zellen wurde anfänglich im Zytoplasma und endoplasmatischem Retikulum (ER) befindliches c-Abl nach Infektion mit *H. pylori* in fokalen Kontaktstellen und *Membran-Ruffles* dokumentiert. Ein ähnlicher Effekt wurde in den gastralen Zelllinien MKN-28 und AGS bestätigt (Poppe *et al.*, 2007).

Inwieweit die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> einen Einfluss auf dessen Lokalisierung im Zytoplasma und speziell an Bereichen der Zellmembran bewirkt, wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen in dieser Arbeit untersucht. Der Einfluss der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung auf die Lokalisierung von c-Abl wurde anhand von AGS Zellen veranschaulicht, die ein exogenes, EGFP-markiertes c-Abl<sup>wt</sup>- oder c-Abl<sup>T735A</sup>-Protein exprimierten (Ergebnisse, Kapitel 5.4). Vor Infektion der Zellen mit *H. pylori* zeigte sich eine sehr homogene zytoplasmatische Verteilung des EGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-Proteins mit einer deutlich geringeren Kernlokalisierung (Ergebnisse, Abb. 5.18). Im Zuge einer sechsständigen Infektion dieser Zellen mit *H. pylori* führte dies zu einer massiven Elongation und einer signifikanten Konzentration von zytoplasmatischem EGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-Protein im Bereich der Zellmembran. Der Zellkern wies nur marginale Mengen des EGFP-c-Abl<sup>wt</sup>-Proteins auf. Diese *H. pylori*-induzierte Membranassoziation von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> erfolgte jedoch nicht einheitlich über die gesamte Zellmembran, sondern konzentrierte sich auf die Bereiche der Zellendungen und fokalen Kontaktstellen der infizierten Zellen. Eine mögliche Ursache für

diese Translokation von c-Abl in Bereichen fokaler Kontaktstellen stellt die Stimulierung von Integrinen durch *H. pylori* dar (Kwok *et al.*, 2007).

Eine solche auf Integrin-Stimulierung basierende Translokation von c-Abl an fokale Kontaktstellen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Eine Stimulierung von  $\beta_2$ -Integrinen in Fibroblasten mit Fibronektin, einem Integrin-Liganden aus der extrazellulären Matrix, resultiert in einer Translokation von nukleärem c-Abl in die fokalen Kontaktstellen der stimulierten Zellen (Lewis *et al.*, 1996). Eine Ausplattierung von Fibroblasten auf Fibronektin induziert eine von Abl-Familie-Kinasen abhängige Membranprotrusion (Vorauschieben), die unter Einsatz des Abl-spezifischen Inhibitors STI-571 deutlich minimiert wird (Lapetina *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2004; Woodring *et al.*, 2002; Radha *et al.*, 2007; Jin und Wang, 2007).

Eine Abl-vorangetriebene Elongation der *H. pylori*-infizierten Zellen basierend auf dessen Lokalisierung im Bereich der Zellendigungen erklärt die deutlich schwächer ausgeprägte Elongation der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen. Die Reduktion der Zellelongation basiert höchstwahrscheinlich auf der vornehmlichen Kernlokalisierung des c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteins (Ergebnisse, Abb. 5.19). Eine Aktivierung von nukleärem c-Abl minimiert die zytoplasmatische Funktion der Tyrosinkinase. Die Infektion der Zellen mit *H. pylori* resultierte zwar auch in einem geringen Signal des EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteins im Zytoplasma, das jedoch keine Konzentration im Bereich der Zellmembran aufwies. Eine mögliche Ursache für die zytoplasmatische Lokalisierung des EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteins könnte eine Assoziation mit endogenem c-Abl-Protein in diesen Zellen sein. Endogenes c-Abl könnte mit exogenem EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> über Oligomerisation assoziieren und partiell dessen Lokalisierung im Zytoplasma der *H. pylori*-infizierten AGS Zellen bewirken (Fan *et al.*, 2003). Auffallend war zudem die dominante Kernlokalisierung des EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteins vor einer Infektion mit *H.pylori*.

Diese Beobachtung geht nicht konform mit den von Yoshida *et al.* (2005) beschriebenen Ergebnissen. Deren Experimente zur Lokalisierung von c-Abl in Abhängigkeit von dessen Phosphorylierung an T<sup>735</sup> wurden in human embryonalen Nierenzellen (HEK 293T) und nicht in gastralen Epithelzellen durchgeführt. Desweiteren wurden in der hier vorgelegten Arbeit an Stelle der von Yoshida verwendeten Flag-markierten c-Abl-Fusionsproteine (Yoshida *et al.*, 2005) EGFP-markierte c-Abl-Fusionsproteine in den gastralen Epithelzellen überexprimiert. Eine mögliche Mutation des nukleären Exportsignals des EGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> konnte durch eine Sequenzierung des Expressionsplasmids ausgeschlossen werden.

Neben einer Infektion mit *H. pylori* zeigte eine Stimulierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PMA in den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> und pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden AGS Zellen deutliche Unterschiede in der Lokalisierung der EGFP-markierten c-Abl-Proteine und den morphologischen Veränderungen der Zellen (Ergebnisse, Abb. 5.20-5.21). Während die Stimulierung der pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> exprimierenden AGS Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PMA eine zytoplasmatische

Verteilung von c-Abl begünstigte, unterstrich sie in den pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen die massive Kernlokalisierung des Proteins. Die Applikation dieser beiden Stimulanzen resultierte in einer drastischen Abrundung der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen, wohingegen die pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> exprimierenden Zellen eine flächige Morphologie mit spitzen Membranfortsätzen aufwiesen. In Fibroblasten wurde bereits mehrfach eine c-Abl-abhängige Bildung von Mikrospikes und einer damit einhergehenden Umstrukturierung von F-Aktin seitens c-Abl gezeigt (Woodring *et al.*, 2002; Woodring *et al.*, 2004; Peacock *et al.*, 2010). Obwohl einer solchen Interaktion zwischen c-Abl und F-Aktin ein inhibitorischer Effekt nachgesagt wird, zeigten Untersuchungen des konstitutiven Bcr-Abl Fusionsproteins eine gegenteilige Wirkung. Untersuchungen zeigten, dass eine Assoziation von Bcr-Abl mit F-Aktin nicht in einer Inaktivierung der Abl-Kinaseaktivität resultiert (Mc Whirter *et al.*, 1991; Mc Whirter *et al.*, 1993).

Inwieweit es sich bei den hier dokumentierten Prozessen um eine solche Interaktion von c-Abl mit F-Aktin handelt, bedarf weiterer Untersuchungen. Bezüglich der Aktivierung von c-Abl durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PMA konnte eine Aktivierung von c-Abl mittels Western Blot nachgewiesen werden (Ergebnisse, Kapitel 5.5, Abb. 5.23). Eine Korrelation zwischen der Lokalisierung von c-Abl<sup>wt</sup> im Zytoplasma der Zellen und einer Bindung mit 14-3-3 wurde mittels Ko-Immunpräzipitationsanalysen eruiert (Kapitel 6.3).

### **6.3 Eine Infektion gastraler Epithelzellen mit *H. pylori* fördert die Interaktion von c-Abl und 14-3-3**

Die Lokalisierung von c-Abl entscheidet maßgeblich über die Wirkungsweise der Tyrosinkinase in den Zellen. Das Bindeprotein 14-3-3 ist ein weiterer wichtiger Faktor, der die Lokalisierung von c-Abl in der Zelle beeinflusst (Yoshida *et al.*, 2005; Nihira *et al.*, 2008; Mancini *et al.*, 2009). Eine Interaktion von c-Abl mit 14-3-3 resultiert in einer Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma der Zellen und fördert bei einer Aktivierung von c-Abl dessen zytoplasmatische Wirkungsweise (Yoshida *et al.*, 2005; Nihira *et al.*, 2008). In CML- und ALL-Zellen konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivität von Bcr-Abl im Zytoplasma der Zellen die anti-apoptotische Wirkung dieses Protoonkogens vorantreibt. Dies basiert maßgeblich auf der Verankerung von Bcr-Abl im Zytoplasma der Zellen durch dessen Bindung an zytoplasmatisches 14-3-3 (Mancini *et al.*, 2009; Mancini *et al.*, 2011; Corradi *et al.*, 2011). In *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen ist c-Abl vornehmlich im Zytoplasma der Zellen und im Bereich der Zellmembran lokalisiert (Pope *et al.*, 2007).

Eine Korrelation der zytoplasmatischen Lokalisierung von c-Abl und dessen Interaktion mit 14-3-3 in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen konnte im Zuge dieser Arbeit anhand von Ko-Immunpräzipitationsstudien erbracht werden (Kapitel 5.12). AGS Zellen wiesen bereits vor der Infektion mit *H. pylori* eine Interaktion von endogenem c-Abl und 14-3-3 auf.



Im Verlauf der *H. pylori*-Infektion zeigte sich eine Intensivierung dieser Bindung nach sechs Stunden (Ergebnisse, Abb. 5.37). Die Abhängigkeit dieser *H. pylori*-induzierten 14-3-3-c-Abl-Interaktion von der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl wurde in Zellen, die exogenes Flag-markiertes c-Abl<sup>wt</sup>- oder c-Abl<sup>T735A</sup>-Protein exprimierten, bestätigt. Die Ko-Immunpräzipitation der beiden Proteine erfolgte sowohl über einen Flag-Antikörper gegen Flag-markiertes c-Abl als auch über einen 14-3-3-spezifischen Antikörper (Ergebnisse, Abb. 5.38). Die Ko-Immunpräzipitation von 14-3-3 und exogenem Flag-c-Abl<sup>wt</sup> über einen anti-Flag Antikörper resultierte in einer relativ schwachen Bandenintensität von 14-3-3. Die Ko-Immunpräzipitation von exogenem Flag-c-Abl<sup>wt</sup> über einen anti-14-3-3 Antikörper in AGS Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg der Bindung dieser beiden Proteine nach einer vierstündigen *H. pylori*-Infektion. Im Gegensatz dazu wiesen die pcDNA3.1-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden *H. pylori*-infizierten AGS Zellen eine signifikant geringere Interaktion von 14-3-3 und c-Abl auf. Es war anzunehmen, dass eine Präzipitation von 14-3-3 in den *H. pylori*-infizierten AGS Zellen nicht in einer Ko-Immunpräzipitation von exogenem Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> resultiert. Jedoch könnte eine Bindung von endogenem c-Abl mit 14-3-3 eine Bindung von Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> an 14-3-3 über eine Interaktion von exogenem Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> und endogenem c-Abl zur Folge gehabt haben. Eine homologe Interaktion von endogenem c-Abl wurde bereits in der Literatur beschrieben (Fan *et al.*, 2003). Die Bindung des endogenen c-Abl an 14-3-3 könnte somit eine Ko-Präzipitation von Flag-c-Abl<sup>T735A</sup> durch Dimerisierung mit endogenem c-Abl zur Folge gehabt haben.

Anhand einer zweiten Methode zur Identifizierung von c-Abl Bindungspartnern wurde die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (*tandem affinity purification*, TAP) angewandt (Kapitel 5.12). Diese Methode beruht auf der Expression des exogenen TAP-markierten Proteins in den Zellen. Die TAP-Markierung besteht aus einer Calmodulin- und einer Streptavidin-Proteinmarkierung an dem gesuchten Protein. Im Zuge der Aufreinigung erfolgt eine Präzipitation des TAP-markierten Proteins über Calmodulin- und Streptavidin-Bindeprotein-überzogenen Sepharosekügelchen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse möglicher Bindungspartner ([www.stratagene.com](http://www.stratagene.com), 2012).

Im Rahmen der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung wurden die vier zytoplasmatischen Proteine  $\alpha$ -Actinin 4, Myosin 9, Tubulin  $\alpha$  und Tubulin  $\beta$  als Bindungspartner der TAP-markierten c-Abl<sup>wt</sup>- und c-Abl<sup>T735A</sup>-Proteine nach einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert (Ergebnisse, Tabelle 5.1). Das Ergebnis dieser Aufreinigung entsprach nicht dem zu erwartenden Resultat. Es handelte sich bei den vier Bindungspartnern um zytoplasmatische Proteine, die zum Teil eine stärkere Bindung mit TAP-c-Abl<sup>T735A</sup> eingingen als mit TAP-c-Abl<sup>wt</sup>. Die TAP-Methode konnte jedoch nur einmal während dieser Arbeit durchgeführt werden. Das Ergebnis der Analyse sollte daher als eine Art Ausblick für zukünftige

Interaktionsstudien von c-Abl in Abhängigkeit von dessen Phosphorylierung an T<sup>735</sup> betrachtet werden (Ergebnisse, Abb. 5.39).

Die spezifische Bindung von Myosin 9 und TAP-c-Abl ist zudem in Frage zu stellen, da dieses an Calmodulin bindet und die TAP-Aufreinigung auf der Bindung von Calmodulin an die mit Calmodulin-Bindeprotein überzogene Sepharosekügelchen basiert (<http://www.uniprot.org>, 2012). Eine unspezifische Bindung von Myosin an die Calomodulinbindeproteine der Sepharose müsste in einem weiteren Experiment ausgeschlossen werden. Die Expression des TAP-Proteins in *H. pylori*-infizierten Zellen in dem oben beschriebenen Versuchsansatz würde Aufschluss über eine solche unspezifische Bindung geben. Es ist jedoch in Frage zu stellen, ob diese Methode für Interaktionsstudien von c-Abl mit zellulären Interaktionspartnern basierend auf der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl geeignet ist. Eine Analyse der Interaktionspartner basierend auf einer Immunpräzipitation scheint aufgrund der positiven Ergebnisse geeigneter zu sein.

#### 6.4 *H. pylori* induziert Apoptose in gastralen Epithelzellen

Die Aufrechterhaltung eines strukturierten Gewebeverbandes basiert auf der Homöostase des Epithels und beinhaltet eine Balance zwischen Proliferation und Apoptose der epithelialen Zellen. Dies gilt auch für die Homöostase gastralen Gewebes, in dem ein äquivalentes Verhältnis von Proliferation und Apoptose der gastralen Mukosa über den Ausgleich apoptotischer und proliferierender Zellen herrscht (Hall *et al.*, 1994). Diese Balance des Magenepithels kann im Zuge einer Infektion mit *H. pylori* massiv beeinflusst werden, ein Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation der gastralen Zellen bewirken und somit maßgeblich zu einer Entstehung von gastralen Krankheiten beitragen (Xia *et al.*, 2001). Eine apoptotische Wirkung von *H. pylori* wurde bereits mehrfach sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bewiesen. Während *in vivo* Faktoren wie die Zugehörigkeit zu ethnischen Gruppen, Lebensumstände oder Art des *H. pylori*-Stamms Ausschlag gebend sind, beeinflussen in *in vitro* Studien die Wahl von Zelllinien und *H. pylori*-Stämmen, die Zellkulturbedingungen, die Anwesenheit bestimmter *H. pylori*-Virulenzfaktoren, die applizierte Menge an Bakterien sowie die gewählte Infektionszeit die Induktion von pro- und anti-apoptotischen Prozessen in den Zellen maßgeblich (Ashktorab *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000; Le'Negrato G *et al.*, 2000).

Ein Ziel dieser Forschungsarbeit war es, herauszufinden, ob eine Verschiebung der Balance zwischen Proliferation und Apoptose in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen auf einem Einfluss der *H. pylori*-induzierten T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl basiert (Kapitel 5.6-5.7). Der Fokus lag hierbei auf der Induktion von Apoptose und Zellviabilität in den *H. pylori*-infizierten Zellen. Eine Infektion der gastralen Epithelzellen AGS mit *H. pylori* für einen Zeitraum von 48 Stunden resultierte in einer zeitabhängigen Induktion von Apoptose in den

infizierten Zellen (Ergebnisse, Abb. 5.25). Eine Infektion der Zellen mit *H. pylori* in einer MOI von 100 (*multiplicity of infection*) führte erstmals nach 24 Stunden zu einem signifikanten Unterschied zwischen schein- und tatsächlich infizierten Epithelzellen nach Messung der apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-Färbung im FACS. Der Anteil an apoptotischen Zellen erhöhte sich kontinuierlich mit steigender Infektionszeit. Sechs Stunden nach Infektion beinhaltete dieser 13%, nach 24 Stunden 39% und nach 48 Stunden 78% apoptotische Zellen, wohingegen der Anteil apoptotischer Zellen in der scheininfizierten Kontrolle nach sechs und 24 Stunden bei 13% und 16% und nach 48 Stunden bei 30% lag. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen einer zweiten Analysemethode, einem Zellviabilitätsassay, in dem die Anzahl lebendiger Zellen nach *H. pylori*-Infektion bestimmt wurde. Diese Ergebnisse gehen mit den in der Literatur dokumentierten Ereignissen konform (Shirin *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1997; Ashktorab *et al.*, 2008).

#### **6.4.1 Eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> resultiert in einer Verzögerung der *H. pylori*-induzierten Apoptose infizierter Epithelzellen**

Ein Zusammenhang zwischen *H. pylori*-induzierter Apoptose und einem Einfluss der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung war bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht beschrieben worden. Anhand der durchgeführten Experimente konnte eine anti-apoptotische Wirkung in Abhängigkeit von dem Grad der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in den *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen aufgezeigt werden (Kapitel 5.7). In AGS Zellen, die exogenes pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierten, wurde eine vermehrte Induktion von Apoptose sowohl in zeitlicher als auch in quantitativer Abhängigkeit der eingesetzten *H. pylori* Zellzahl dokumentiert (Ergebnisse, Abb. 5.27-5.29). Das Ergebnis dieser Experimente ist in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Anhand der Ergebnisse wurde gezeigt, dass eine *H. pylori*-Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen mit MOI 50 nach 6 Stunden, MOI 10 nach 48 Stunden und mit MOI 100 nach 24 Stunden den deutlichsten Unterschied in der Induktion von Apoptose bewirkte.

Dieser positive Effekt der *H. pylori*-induzierten T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl auf das Zellüberleben wurde anhand des Zellviabilitäts-Assays bestätigt (Ergebnisse, Abb. 5.30). Unter Verwendung dieses zweiten Assays wiesen die pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen nach 24-stündiger *H. pylori*-Infektion die größte Differenz von lebendigen Zellen auf. Eine Infektion der pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen mit *H. pylori* resultierte in einer signifikanten Reduktion der Zahl lebendiger Zellen im Vergleich zu den pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> exprimierenden Zellen.

**Tabelle 6.1: Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen nach *H. pylori*-Infektion**

6 Stunden <i>H. pylori</i> -Infektion				
	Kontrolle	MOI10	MOI50	MOI100
pEGFP-c-Abl <sup>wt</sup>	18%	15%	12%	16%
pEGFP-c-Abl <sup>T735A</sup>	15,4%	22%	21%	21%
24 Stunden <i>H. pylori</i> -Infektion				
	Kontrolle	MOI10	MOI50	MOI100
pEGFP-c-Abl <sup>wt</sup>	30%	29%	27%	26%
pEGFP-c-Abl <sup>T735A</sup>	31%	31%	35%	45%
48 Stunden <i>H. pylori</i> -Infektion				
	Kontrolle	MOI10	MOI50	MOI100
pEGFP-c-Abl <sup>wt</sup>	25%	29%	51%	69%
pEGFP-c-Abl <sup>T735A</sup>	33%	53%	68%	86%

Die Tabelle zeigt die Zusammenfassung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen aus Kapitel 5.7, Ergebnisse, Abb. 5.27-5.29.

Die Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> und eine mögliche Interaktion mit zytoplasmatischen Bindungspartnern wie 14-3-3 könnte eine zeitliche Verzögerung apoptotischer Prozesse bewirken. Desweiteren würde ein Zurückhalten von c-Abl durch 14-3-3 dessen zytoplasmatische Funktionen wie die Zellmigration während einer *H. pylori*-Infektion positiv vorantreiben. Eine Bindung des Bcr-Abl-Fusionsproteins mit 14-3-3 im Zytoplasma von Leukämie-Zellen wurde in direkte Verbindung mit der Suppression von apoptotischen und proliferativen Signalen basierend auf der Aktivität von Bcr-Abl in diesen Zellen gebracht (Mancini *et al.*, 2009). Eine mögliche Therapieform basiert auf einem Nicht-Peptid Inhibitor gegen das Bindungsprotein 14-3-3<sup>5</sup>. Desweiteren führte eine Mutation der 14-3-3-Bindestelle an Bcr-Abl und anschließende Inkubation mit dem Abl-Inhibitor STI zu einer signifikanten Steigerung der Zytotoxizität in Bcr-Abl exprimierenden hämatopoetischen Zellen (Mancini *et al.*, 2011). Eine Bindung an zytoplasmatische Proteine könnte zudem eine Interaktion von aktiviertem c-Abl mit Caspasen und eine damit einhergehende Induktion von Apoptose unterbinden oder zeitlich verzögern.

*H. pylori*-induzierte Apoptose in gastralen Epithelzellen wurde mehrfach mit der Aktivierung von Caspasen in Verbindung gebracht. In Abhängigkeit von der Infektionszeit und der MOI an appliziertem *H. pylori* führt dies zu einer Aktivierung der Initiatorprotease Caspase-8 (Ashktorab *et al.*, 2008). Die Initiierung dieser apoptotischen Caspase-Kaskade resultiert unter anderem in einer Aktivierung der Caspase-9 und Caspase-3 und somit in der Spaltung des Caspase-3 Substrates PARP (Ashktorab *et al.*, 2008; Mojtahedi *et al.*, 2007; Pierzchalski *et al.*, 2009). Eine Interaktion von c-Abl mit Caspasen der apoptotischen Caspase-Kaskade wurde bereits beschrieben (Barila *et al.*, 2003; Machuy *et al.*, 2004; Raina *et al.*, 2005). Auslöser der Apoptose war genotoxischer Stress, verursacht durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Cisplatin. Auf

der Seite der Caspasen führte eine Aktivierung von c-Abl zu einer Phosphorylierung von Caspase-9 an Tyrosin<sup>153</sup> und der Aktivierung von Caspase-3 (Raina *et al.*, 2005). Neben einem unterstützenden Effekt auf die Caspase-induzierte Apoptose basierend auf deren Aktivierung durch c-Abl, erfolgt zudem eine c-Abl-induzierte Apoptose basierend auf dessen Spaltung durch aktivierte Caspasen. Eine Stimulierung epithelialer Zellen mit Cisplatin oder des Fas-Rezeptors führt zur Aktivierung der Caspasen -3, -8 und -9 (Barila *et al.*, 2003; Machuy *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass alle dieser drei Caspasen eine Spaltung von c-Abl am c-terminalen Ende des Proteins bewirken. Die daraus entstandenen Spaltprodukte bestehen aus einem 25 kDa großen c-Abl Fragment, das die Aktin-Bindedomänen und das nukleare Exportsignal beinhaltet und einem 120 kDa großen c-Abl Fragment, das die SH2-, SH3-, Tyrosinkinasedomäne und die nukleare Lokalisierungssequenz inklusive der Phosphorylierungsstelle T<sup>735</sup> beinhaltet. Unter Einfluss von genotoxischem Stress transloziert das 120 kDa große c-Abl aufgrund der fehlenden Aktin-Bindestellen in den Zellkern. Eine Translokation von c-Abl aus dem Zellkern ist wegen des fehlenden nuklearen Exportsignals nicht möglich. C-Abl akkumuliert im Zellkern und wirkt unterstützend auf apoptotische Prozesse (Barila *et al.*, 2003; Machuy *et al.*, 2004).

Basierend auf der Interaktion von c-Abl und Caspasen und deren Aktivierung während einer *H. pylori*-Infektion wurde überprüft, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem anti-apoptotischen Effekt der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl und der Aktivierung von Caspase-3 in der *H. pylori*-induzierten Apoptose besteht. Eine Infektion der in dieser Arbeit etablierten stabil transfizierten Zelllinien AGS pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> mit *H. pylori* zeigte bereits eineinhalb Stunden nach Infektion deutliche Unterschiede in der Spaltung des Caspase-3 Substrates PARP. Die pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits das 89 kDa große PARP-Spaltprodukt auf, während die c-Abl<sup>wt</sup> exprimierenden Zellen erst vier Stunden nach *H. pylori*-Infektion eine vergleichbare Menge an gespaltenem PARP aufzeigten (Ergebnisse, Abb. 5.31). Dies lässt auf eine gesteigerte Aktivität der Caspase-3 in den pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen schließen und bietet eine mögliche Erklärung für das erhöhte Maß an apoptotischen Zellen während einer *H. pylori*-Infektion.

### **6.5 Die Expression von c-Abl<sup>T735A</sup> inhibiert die *H. pylori*-induzierte Zellmigration infizierter gastraler Epithelzellen**

Ein charakteristisches Merkmal für eine *H. pylori*-Infektion gastraler Epithelzellen ist die Ausbildung des sogenannten „Hummingbird“- oder „Elongation“-Phänotyps. Dieses phänotypische Charakteristikum und die massive Induktion der Zellmotilität während einer *H. pylori*-Infektion sind abhängig von der Anwesenheit des in die Wirtszelle injizierten *H. pylori*-Pathogenitätsfaktors CagA und einem noch unbekannten T4SS-Faktor (Segal *et al.*,

1999; Backert *et al.*, 2001b; Churin *et al.*, 2001; Churin *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2002). Dieser Phänotyp wird eng mit der Pathogenese von *H. pylori* in Verbindung gebracht, da er Prozesse wie Immunantwort, Wundheilung, Metastasen-Bildung oder invasives Wachstum von Krebszellen *in vivo* beeinträchtigen könnte (Ridley *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2008). Der *H. pylori*-induzierte *Elongation*-Phänotyp ähnelt dem Wachstumsfaktor-induzierten *Scatter*-Phänotyp. Dieser basiert auf mehreren Prozessen, bestehend aus einer erhöhten Zellbewegung, die auf der Umlagerung des Zytoskeletts und dem Auf- und Abbau von Zell-Matrix-Kontakten in den fokalen Kontaktstellen beruht (Moese *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2008). Die durch CagA hervorgerufenen, charakteristischen phänotypischen Veränderungen der *H. pylori*-infizierten Zellen basieren auf dessen Funktion als Gab-ähnlichem Adapter- oder auch *Masterkey*-Protein sowohl in nicht phosphoryliertem Zustand als auch auf dessen Tyrosinphosphorylierung an den EPIYA-Motiven A-C (Hatakeyama 2003; Botham *et al.*, 2008; Backert *et al.*, 2010; Asahi *et al.*, 2003; Mimuro *et al.*, 2002; Kwok *et al.*, 2007;). Die Tyrosinphosphorylierung von CagA erfolgt nach Translokation des Pathogenitätsfaktors durch die zellulären Tyrosinkinasen Src und c-Abl in der Wirtszelle (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). Src und c-Abl werden im Zuge der *H. pylori*-Infektion in Abhängigkeit von dessen T4SS aktiviert, was in einer Tyrosinphosphorylierung von CagA resultiert. Während eine Phosphorylierung von CagA durch Src in den ersten zwei Stunden der *H. pylori*-Infektion erfolgt, basiert dessen Phosphorylierung bis zu sechs Stunden nach Infektion auf der *H. pylori*-induzierten c-Abl-Aktivität (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007).

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> und der *H. pylori*-induzierten Zellmotilität in Verbindung gebracht (Kapitel 5.11). Eine Infektion von AGS Zellen, die stabil pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> oder pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierten, zeigte einen signifikanten Unterschied im Migrationsverhalten dieser Zellen auf einer porösen Filtermembran (Ergebnisse, Abb. 5.36). Während die pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> exprimierenden Zellen nach 24 Stunden *H. pylori*-Infektion im Vergleich zu den scheininfizierten Kontrollzellen eine 4,3-fach erhöhte Zellmigration aufwiesen, führte eine Infektion der pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen lediglich zu einer 2,5-fachen Erhöhung der Zellmigration in Abhängigkeit von den Kontrollzellen. Aufgrund der erhöhten Expression von pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> in den Zellen wäre es zu erwarten gewesen, dass diese im Vergleich zu nicht transfizierten AGS Zellen ein noch höheres Maß an Zellmigration aufweisen. Dies war jedoch nicht der Fall. Die nicht transfizierten *H. pylori*-infizierten AGS Zellen wiesen eine 4,7-fach erhöhte Zellmigration im Vergleich zu den scheininfizierten Zellen auf. Dies könnte durch eine bereits durch endogenes c-Abl vollständige Besetzung der zytoplasmatischen Interaktionspartner begründet sein und einer daraus resultierenden Erhöhung der Zellmigration. Dem signifikanten Unterschied im Zellmigrationsverhalten der pNTAP-c-

Abl<sup>T735A</sup>-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup>-exprimierenden Zellen liegt höchstwahrscheinlich deren differierende Lokalisierung zugrunde. Es ist daher anzunehmen, dass eine auf der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>-basierende Bindung von zytoplasmatischen Proteinen wie 14-3-3 eine erhöhte Zellmigration während einer *H. pylori*-Infektion vorantreibt. Die Vermutung liegt nahe, dass eine vermehrte Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma die Komplexbildung mit CagA erhöht und somit zu einer Steigerung der *H. pylori*-induzierten Zellmotilität beiträgt. Ein Unterschied in der Tyrosinphosphorylierung von CagA in pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden AGS Zellen wurde jedoch nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es wurde bereits gezeigt, dass eine *H. pylori*-Infektion epithelialer Brustkrebszellen mit einer CagA-defizienten Mutante in einer signifikanten Verringerung der Invasivität dieser Zellen resultiert. Eine Verringerung der Zellmotilität konnte in diesem Zusammenhang jedoch nicht nachgewiesen werden (C. Weydig Dissertation, 2009).

#### **6.6 Bakterieller CagL ist essentiell für die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> und führt zu einer Verminderung *H. pylori*-induzierter Apoptose in infizierten gastralen Epithelzellen**

Neben der Identifikation der zellulären Threoninkinasen wurde der Einfluss der bakteriellen Faktoren auf die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> untersucht (Kapitel 5.3). Aus vorangegangenen Experimenten in MCF-7 Zellen war bereits bekannt, dass eine Induktion der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl einer intakten *cagPAI* und eines funktionellen T4SSs von *H. pylori* bedurfte (S. Schneider Diplomarbeit, 2007). Diese Ergebnisse wurden in der gastralen Zelllinie AGS im Zuge dieser Arbeit bestätigt (Ergebnisse, Abb. 5.15). Desweiteren wurde anhand der Infektionsexperimente mit *H. pylori*-Mutanten gezeigt, dass das Vorhandensein des Pathogenitätsfaktors VacA keinen Einfluss auf die Induktion der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl während einer Infektion ausübt.

Im Verlauf einer *H. pylori*-Infektion bindet das bakterielle Adhäsion CagL an  $\alpha_5\beta_1$  Integrine infizierter Epithelzellen (Kwok *et al.*, 2007). Eine Infektion von AGS Zellen mit einer *H. pylori*-Mutante, deren bakterieller Faktor CagL deletiert wurde ( $\Delta cagL$ ), zeigte eine Abhängigkeit der *H. pylori*-induzierten c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung von der Anwesenheit dieses bakteriellen Adhäsins (Ergebnisse, Abb. 5.16). Im Vergleich zu der Infektion von AGS Zellen mit einem *H. pylori*-Wildtyp oder einem rekonstituierten  $\Delta cagL/cagL^{wt}$ -*H. pylori*-Stamm wiesen die  $\Delta cagL$ -infizierten Zellen eine schwache T<sup>735</sup>-Phosphorylierung auf, die nur etwas über der Kontrollzellen lag. Die T<sup>735</sup>-Phosphorylierung hervorgerufen durch den  $\Delta cagL/cagL^{wt}$ -*H. pylori*-Stamm glich der Intensität des *H. pylori*-Wildtyps. Die Induktion der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung durch eine Integrin-Aktivierung wurde unabhängig von *H. pylori* durch eine

Stimulierung der Zellen mit  $\text{MnCl}_2$  bestätigt. Eine Inkubation der Zellen mit  $\text{MnCl}_2$  resultierte in einer  $\text{T}^{735}$ -Phosphorylierung, vergleichbar mit der Intensität hervorgerufen durch *H. pylori*. Eine Infektion gastraler Epithelzellen mit *H. pylori* resultiert in einer Vielzahl zellulärer Ereignisse, die in ihrer Gesamtheit Apoptose fördernd oder inhibierend wirken. Dieses Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose, das entsprechend des jeweiligen Stimulus in die eine oder andere Richtung verlagert wird, basiert maßgeblich auf dem Vorhandensein der *H. pylori*-Virulenzfaktoren. Eine Infektion von AGS Zellen, die exogenes pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> exprimieren, mit der *H. pylori* Deletionsmutante  $\Delta\text{cagL}$  resultierte in 57% Apoptose der infizierten Zellen (Ergebnisse, Kapitel 5.10, Abb. 5.34). Im Vergleich dazu wiesen die Zellen, die mit dem *H. pylori*-Wildtyp Stamm oder mit der CagL-rekonstituierten CagL-Mutante  $\Delta\text{cagL}/\text{cagL}^{\text{wt}}$  infiziert wurden, mit 42% und 46% Apoptose ein geringeres Maß an apoptotischen Zellen auf. Diese Ergebnisse wurden anhand eines Zellviabilitäts-Assays durch die Bestimmung der Zahl lebendiger Zellen während einer Infektion mit diesen drei *H. pylori*-Stämmen bestätigt (Ergebnisse, Abb. 5.35). Die Anzahl lebendiger Zellen blieb nach Infektion mit dem  $\Delta\text{cagL}/\text{cagL}^{\text{wt}}$ -Stamm der der *H. pylori*-Wildtyp-infizierten Zellen. Die mit  $\Delta\text{cagL}$  infizierten Zellen wiesen 11% weniger lebendige Zellen auf. Dies lässt auf einen anti-apoptotischen Effekt der  $\text{T}^{735}$ -Phosphorylierung in Abhängigkeit von dem bakteriellen CagL während einer *H. pylori*-Infektion schließen. Es sollte jedoch bedacht werden, dass CagL einen wichtigen Faktor für die Translokation des Pathogenitätsfaktors CagA in die infizierten Wirtszellen darstellt (Kwok *et al.*, 2007). Eine Abwesenheit von CagL würde somit den proliferativen und zellmigratorischen Effekt von CagA in den Wirtszellen drastisch reduzieren. Die Interaktion von CagL mit  $\alpha_5\beta_1$  Integrinen trägt zudem maßgeblich zu einer Aktivierung der Tyrosinkinasen Src und FAK und des EGF-Rezeptors bei, was zu einer Steigerung der Zellelongation und Ausbildung fokaler Kontaktstellen führt (Tegtmeyer *et al.*, 2010). Anhand der Experimente dieser Arbeit konnte die Aussage getroffen werden, dass das Vorhandensein von CagL während einer *H. pylori*-Infektion eine Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> vorantreibt und eine anti-apoptotische Wirkung innehat.

### **6.7 PKC vermittelt die *H. pylori* induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in infizierten Epithelzellen**

Die von Nihira *et al.* beschriebene Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> basiert auf einer transienten Aktivität der Kinase TTK, die kurzzeitig unter dem Einfluss von oxidativem Stress ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) anzusteigen vermag (Nihira *et al.*, 2008). Inwiefern es sich bei der *H. pylori*-induzierten  $\text{T}^{735}$ -Phosphorylierung an c-Abl um eine TTK-vermittelte Reaktion handelte, sollte im Zuge dieser Arbeit in Erfahrung gebracht werden (Kapitel 5.2.1). Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von verschiedenen Versuchstechniken angewandt, deren Ergebnisse vermehrt auf eine *H. pylori*-induzierte c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung durch die Serin/Threoninkinasen PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup>



hindeuten. Es handelt sich vermutlich bei der beobachteten T<sup>735</sup>-Phosphorylierung nach Infektion der Zellen mit *H. pylori* um eine Überlagerung zweier Prozesse. So wurde ein genereller Einfluss von TTK durch Expression einer Kinase-inaktiven Form (TTK<sup>KD</sup>) sowohl auf die T<sup>735</sup>-Phosphorylierung von c-Abl als auch auf den Gesamtgehalt von c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion beobachtet. Die Anwesenheit des TTK<sup>KD</sup>-Proteins führte in den infizierten Zellen sowohl zu einer Verringerung der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung, als auch zu einem Ausbleiben der Akkumulation von c-Abl (Ergebnisse, Abb. 5.8).

In einem weiterführenden Experiment wurde die Transkription des TTK-Gens mittels siRNA signifikant reduziert (Ergebnisse, Abb. 5.11). Dies führte zu einer Verminderung des TTK-Gehaltes und einem Anstieg an c-Abl sowohl in den scheininfizierten Kontrollzellen als auch in den *H. pylori*-infizierten Zellen. Gemessen an dem erhöhten c-Abl-Gehalt der Zellen bewirkte die Verminderung des TTK-Proteingehalts eine generelle Minderung der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung in den Kontrollzellen und den *H. pylori*-infizierten Zellen. Möglicherweise bedingt die Anwesenheit einer kinaseinaktiven Form von TTK direkt oder über einen zwischengeschalteten Signalweg, wie zum Beispiel dem Proteasomenweg, eine Verminderung der c-Abl-Akkumulation in *H. pylori*-infizierten Zellen. Findet zudem eine deutliche Verminderung des Gehalts an TTK statt, so bewirkt dies eine deutliche Steigerung von zellulärem c-Abl, die auch durch eine *H. pylori*-Infektion nicht weiter gesteigert werden konnte. All diese Hinweise lassen auf einen TTK-regulierten Signalweg schließen, über den der Gehalt an zellulärem c-Abl reguliert werden kann. Ob dieser auch für eine Akkumulation von c-Abl während einer *H. pylori*-Infektion verantwortlich ist, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Auf der weiteren Suche nach der Threoninkinase, die eine c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung während einer *H. pylori*-Infektion in epithelialen Zellen induziert, wurden mögliche Kinasen, die c-Abl an T<sup>735</sup> zu phosphorylieren vermögen, *in silico* mittels verschiedener Softwareprogramme vorhergesagt (Lasitschka Forschungspraktikum, 2007). Die Analyse ergab zwei signifikante Treffer, die Proteinkinase B (PKB) und die Calmodulin-abhängige Kinase II (CAM II), dazu mit nicht-signifikantem Bindungsmaß die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Casein Kinase (CKI), Proteinkinase A (PKA), Cyclin-abhängige Proteinkinase 2 (cdc2), G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (Grk), AMP-aktivierte Proteinkinasen (AMPK) und Serum und Glucocorticoid-induzierbare Kinasen (SGK). Erstaunlicherweise war TTK in keinem der Software Programme ein Treffer (Lasitschka Forschungspraktikum, 2007).

Neben der Suche *in silico* wurde die in der Literatur bereits beschriebene Interaktion von c-Abl mit einer Reihe von Threoninkinasen mit einbezogen oder Threoninkinasen, die während einer *H. pylori*-Infektion aktiviert werden. Zu diesen zählen die Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) (Colicelli, 2010; Bradley und Koleske, 2009; Antku und Mayer, 2009; Hatakeyama, 2009). Gegen die Kinasen, die in die

engere Auswahl kamen, wurden Inhibitoren in *H. pylori*-Infektionsexperimenten eingesetzt. Von den verwendeten Inhibitoren wurde die c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung während einer *H. pylori*-Infektion nur von zwei PKC-Inhibitoren fast vollständig unterbunden (Ergebnisse, Abb. 5.9).

Eine Behandlung der Zellen mit dem PKC-spezifischen Inhibitor Gö6850 und anschließender Infektion mit *H. pylori* führte zu einer Verminderung der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung, die unter der der scheininfizierten Kontrollzellen lag (Ergebnisse, Abb. 5.9). Neben einer Infektion mit *H. pylori* wurden die Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA und dem von Nihira *et al.* verwendeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert. Beide dieser Agenzien bewirkten eine deutliche Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup>, jedoch vermochte der Inhibitor Gö6850 nur die Induktion des PMA-induzierten p-c-Abl<sup>T735</sup>-Signals im Western Blot auf das Niveau der scheininfizierten Kontrollzellen zu reduzieren, jedoch nicht die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelöste T<sup>735</sup>-Phosphorylierung. Der Einsatz von pan-spezifischer PKC-siRNA bewirkte eine deutliche Minimierung der *H. pylori*-induzierten T<sup>735</sup>-Phosphorylierung, die in ihrer Intensität der der scheininfizierten Kontrollzellen glich.

Eine Interaktion zwischen PKC<sup>δ</sup> und c-Abl wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. PKC<sup>δ</sup> bindet unter Einfluss von genotoxischem oder oxidativem Stress konstitutiv an die SH3-Domäne von c-Abl, was zu einer Tyrosinphosphorylierung und somit Aktivierung von PKC<sup>δ</sup> durch c-Abl im Zytoplasma der Zellen führt (Yuan *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000). Neben einer Interaktion mit c-Abl wurde zudem eine Aktivierung von PKC<sup>α</sup>, PKC<sup>β</sup> und PKC<sup>δ</sup> in *H. pylori*-infizierten Epithelzellen dokumentiert (Brandt *et al.*, 2009; El-Zaatari *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass eine biphasische Aktivierung von PKC<sup>δ</sup> in einem direkten Zusammenhang mit der Ausbildung der *H. pylori*-induzierten Elongation infizierter gastralen Epithelzellen (AGS Zellen) steht. Die Aktivierung von PKC<sup>δ</sup> während einer *H. pylori*-Infektion basiert zum einen auf der Anwesenheit des Pathogenitätsfaktors CagA zu frühen Zeitpunkten der Infektion (30-60 min nach Infektionsbeginn) und zum anderen auf einem cagPAI-abhängigen und bislang unbekannten bakteriellen Faktor zu späten Zeitpunkten einer *H. pylori*-Infektion (240-480 min nach Infektionsbeginn) (Brandt *et al.*, 2009). Eine solche beschriebene Aktivierung von PKC<sup>δ</sup> führt in beiden Fällen zu einer Aktivierung des Ras/SOS → Raf → Mek → Erk1/2 Signalweges, was in der Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Scatter-Phänotyps und der Elongation der infizierten Epithelzellen resultiert (Brandt *et al.*, 2009). Da sowohl c-Abl als auch PKC<sup>δ</sup> beziehungsweise PKC<sup>α</sup> zur Ausbildung dieses *H. pylori*-Phänotyps beitragen und in ähnlichen Zeitfenstern in den infizierten Zellen aktiviert werden, wäre eine Interaktion dieser Kinasen durchaus denkbar (Pope *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007; Brandt *et al.*, 2009). Außerdem wurde eine PKC<sup>α</sup>-, PKC<sup>β</sup>- und PKC<sup>δ</sup>-vermittelte Steigerung der Gastrinsekretion über eine gesteigerte Sonic Hedgehog (Shh)-Expression in *H. pylori*-infizierten Zellen gezeigt (El-Zaatari *et al.*, 2010).

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche PKC-Isoform eine Rolle in der *H. pylori*-induzierten T<sup>735</sup>-Phosphorylierung spielt, wurde zunächst eruiert, inwieweit PKC<sup>δ</sup>, PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> c-Abl *in vitro* an T<sup>735</sup> zu phosphorylieren vermögen (Kapitel 5.2.2). In der *in vitro* Reaktion zeigte sich eine deutliche c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung durch aktiviertes PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup>, die mittels eines pan-spezifischen Inhibitors gegen PKCs auf ein basales Niveau reduziert werden konnte, jedoch nicht durch Einsatz eines spezifischen Inhibitors gegen PKC<sup>δ</sup> (Ergebnisse, Abb. 5.12). Im Falle von PKC<sup>δ</sup> war keine Erhöhung der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> *in vitro* zu beobachten. Die Spezifität der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung wurde zudem durch Verwendung einer phosphorylierungsresistenten c-Abl-Mutante (c-Abl<sup>T735A</sup>) bestätigt (Ergebnisse, Abb. 5.13). Ein Ausbleiben der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung nach gezielter Unterbindung von PKC<sup>α</sup> oder PKC<sup>β</sup> durch spezifische siRNA konnte nicht gezeigt werden, da der *knock down* dieser beiden PKC-Isoformen mit dieser siRNA in mehr als vier Experimenten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurde. In dieser Arbeit wurde anhand von Infektionsexperimenten in *H. pylori*-infizierten AGS Zellen eine Aktivierung von PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> festgestellt. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> um die Threoninkinasen handelt, die eine *H. pylori*-induzierte c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung in infizierten Epithelzellen vorantreiben.

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse lässt dies auf eine mögliche Aktivierung von PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> durch Bindung von bakteriellem CagL des *H. pylori* T4SSs an α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> Integrine *H. pylori*-infizierter Epithelzellen schließen. Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen in Hämatocyten der Spitzschlammschnecke *Lymnaea stagnalis* (Walker *et al.*, 2010). In diesen Zellen führte eine Stimulierung von Integrinen durch Adhäsion der Zellen auf Fibronectin zu einer Aktivierung von PKCs und der fokalen Adhäsions Kinase (FAK), was in einer vermehrten Assemblierung von fokalen Kontaktstellen (FA) in diesen Bereichen und somit der Formation von Lamellipodien und Filopodien führte (Walker *et al.*, 2010).

Die zelluläre Auswirkung der Inhibierung von PKC auf den *H. pylori*-induzierten Zelltod wurde anhand eines Zellviabilitäts-Assays zur Messung der Zahl lebendiger Zellen bestimmt (Ergebnisse Kapitel 5.9, Abb. 5.33). Der Einsatz zweier spezifischer PKC-Inhibitoren resultierte in einer signifikanten Steigerung des *H. pylori*-induzierten Zelltodes von 54% ohne Inhibitor auf 72% und 73% toter Zellen mit PKC-spezifischem Inhibitor nach 48 Stunden Infektion.

Anhand dieses Versuches wurde gezeigt, dass eine Reduktion der Zahl lebendiger Zellen mit der Inhibierung von PKCs korreliert. Ein kausaler Zusammenhang mit dem Unterbinden der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung während einer *H. pylori*-Infektion in diesen Zellen ist durchaus denkbar.

### 6.8 Abschließende Betrachtung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Induktion der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung durch *H. pylori* in infizierten gastralen Epithelzellen gezeigt werden. Auf bakterieller Ebene ist diese abhängig von dem Vorhandensein der *cagPAI*, einem funktionellem T4SS und dem Adhäsin CagL (Abb. 6.1). Die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> ist unabhängig von den bakteriellen Faktoren CagA und VacA, jedoch könnte ein noch nicht identifizierter Faktor, der über das T4SS in die infizierte Wirtszelle transloziert wird, einen Einfluss auf die Phosphorylierung ausüben. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Interaktion von CagL mit Integrinen der Wirtszelle zu einer Aktivierung der Serin/Threoninkinasen PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> führt.

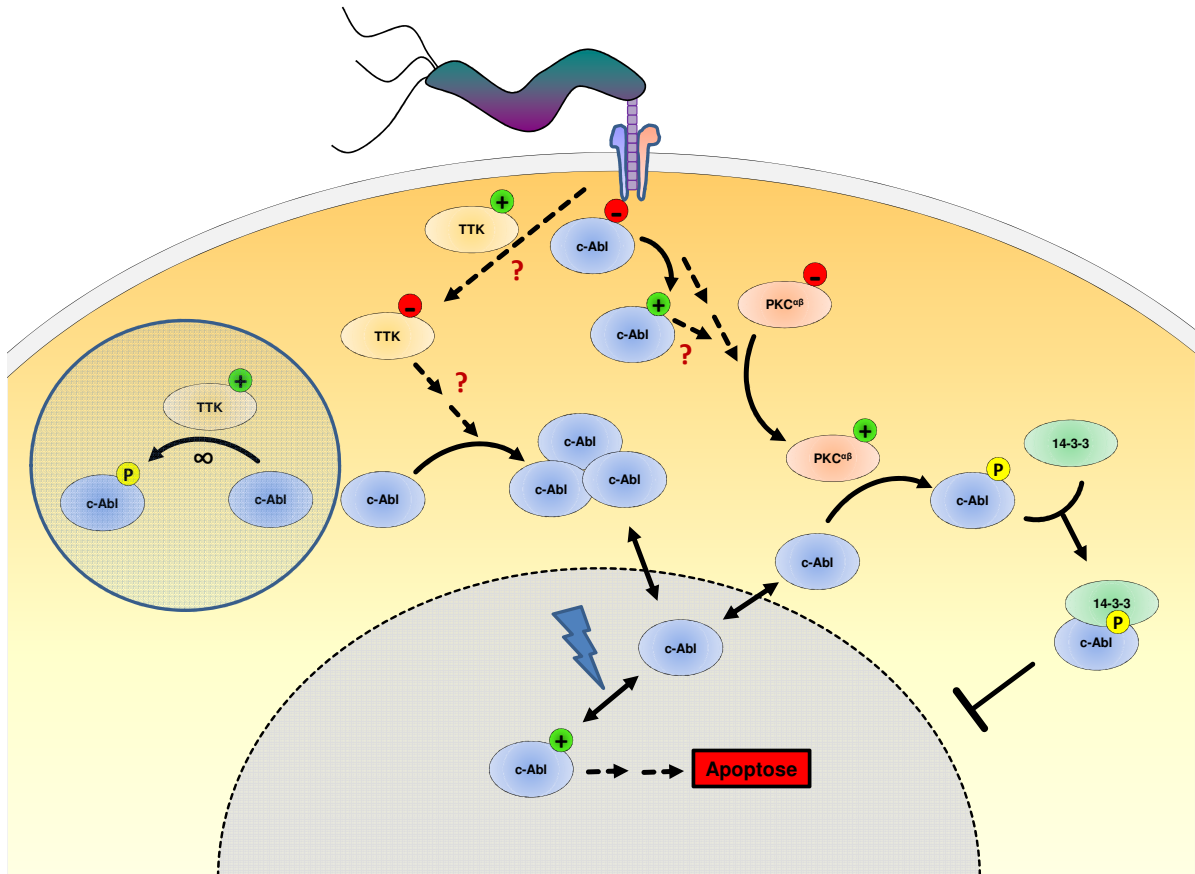
Es wurde eine direkte Verbindung zwischen der Anwesenheit von PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> und der induzierten Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> gezeigt. Aufgrund der biphasischen Aktivierung von PKCs während einer *H. pylori*-Infektion wäre eine Aktivierung dieser durch c-Abl ab vier Stunden nach Infektionsbeginn wahrscheinlich (Abb. 6.1). Eine c-Abl-abhängige Aktivierung von PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> könnte im Gegenzug zu einer Threoninphosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> führen. Eine Möglichkeit, um dies herauszufinden, wäre eine Unterbindung der Expression von c-Abl und eine Analyse der PKC-Aktivierung während der *H. pylori*-Infektion. Eine Vorbehandlung c-Abl exprimierender Epithelzellen mit einem c-Abl-Inhibitor vor *H. pylori*-Infektion könnte ebenso Aufschluss über eine Aktivierung von PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> durch c-Abl geben. Eine Interaktion von c-Abl und PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> über eine Ko-Immunpräzipitation konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden.

Anhand von Immunfluoreszenzanalysen wurde gezeigt, dass eine mögliche Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> eine Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma *H. pylori*-induzierter Epithelzellen bewirkt. Eine sechsstündige *H. pylori*-Infektion resultierte in einer vermehrten Lokalisierung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> an den fokalen Kontaktstellen der infizierten Epithelzellen während die phosphorylierungsresistente EGFPc-Abl<sup>T735A</sup>-Mutante eine deutlichere Kernlokalisierung aufwies. Die Lokalisierung von EGFP-c-Abl<sup>wt</sup> im Zytoplasma der Zellen könnte auf einer Interaktion mit dem Bindeprotein 14-3-3 basieren (Abb. 6.1). Ko-Immunpräzipitations-Analysen aus dieser Arbeit haben eine Intensivierung der Interaktion von Flag-c-Abl<sup>wt</sup> und 14-3-3 während einer sechsstündigen *H. pylori*-Infektion gezeigt.

Auf dieser p-c-Abl<sup>T735</sup>-14-3-3-Interaktion und der daraus resultierenden Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma der *H. pylori*-infizierten Zellen könnte die Verzögerung der *H. pylori*-induzierten Apoptose basieren (Abb. 6.1). *H. pylori*-infizierte Epithelzellen, die pEGFP-c-Abl<sup>wt</sup> exprimierten, wiesen im Gegensatz zu pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen eine deutliche Verzögerung in der Induktion von Apoptose auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die erhöhte Aktivierung von Caspase-3 in pEGFP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen zu früheren Zeitpunkten einer *H. pylori*-Infektion. Die erhöhte Caspase-3-Aktivität in pNTAP-c-

Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen wurde in dieser Arbeit über die Spaltung des Caspase-3-Substrates PARP nachgewiesen.

Die vermehrte Lokalisierung von c-Abl im Zytoplasma in pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> exprimierenden Zellen erklärt die deutlich erhöhte Zellmigration dieser Zellen während einer *H. pylori*-Infektion im Vergleich zu den pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Zellen.



**Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> während einer *H. pylori*-Infektion gastraler Epithelzellen.** *H. pylori* bindet mit seinem T4SS an α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> Integrine epithelialer Zellen. Dies führt unter anderem zu einer Aktivierung (grünes +) von c-Abl, PKC<sup>α</sup> und PKC<sup>β</sup> (PKC<sup>αβ</sup>) (Abb. 6.1 rechts). Die Aktivierung von PKC<sup>αβ</sup> resultiert in einer Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> (p-c-Abl<sup>T735</sup>, symbolisiert durch gelbes P). 14-3-3 bindet an p-c-Abl<sup>T735</sup> und blockiert die Translokation von c-Abl in den Zellkern. Ungebundenes c-Abl transloziert in den Zellkern hinein und aus dem Zellkern heraus. Eine Aktivierung von c-Abl im Zellkern durch beispielsweise genotoxischen Stress (blauer Blitz) begünstigt die Induktion von Apoptose in den Zellen. Eine Bindung von p-c-Abl<sup>T735</sup> an 14-3-3 blockiert die Translokation von c-Abl in den Zellkern und minimiert die *H. pylori*-induzierte Apoptose in infizierten gastralen Epithelzellen. Neben einer *H. pylori*-induzierten Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch PKC<sup>αβ</sup> wird c-Abl an Threonin<sup>735</sup> durch aktiviertes TTK konstitutiv (∞) phosphoryliert (Abb. 6.1 links Schema in blauem Kreis). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten unter anderem auf negative Wirkung von *H. pylori* auf die Aktivität von TTK hin, was eine Akkumulation von c-Abl in den infizierten Zellen zur Folge zu haben scheint (Abb. 6.1 Mitte).

Neben einer anti-apoptotischen Wirkung der T<sup>735</sup>-Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> wurde ein negativer Einfluss des bakteriellen Faktors CagL und der zellulären PKCs auf *H. pylori*-induzierte Apoptose aufgezeigt. Aufgrund der vielen zellulären Prozesse, die das Vorhandensein von CagL und PKC während einer *H. pylori*-Infektion mit sich führt, kann die

anti-apoptotische Wirkung dieser beiden Faktoren nicht ausschließlich in direkten Zusammenhang mit der Induktion der c-Abl<sup>T735</sup>-Phosphorylierung gebracht werden.

Eine initiale Interaktions-Analyse von c-Abl in pNTAP-c-Abl<sup>wt</sup> und pNTAP-c-Abl<sup>T735A</sup> exprimierenden Epithelzellen sollte einen ersten Eindruck über mögliche Unterschiede in der Interaktion dieser beiden Proteine mit möglichen Bindungspartnern während einer *H. pylori*-Infektion geben. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung nicht so gut wie eine Ko-Immunpräzipitation von c-Abl für diese Zwecke eignet. In weiterführenden Experimenten könnten über Ko-Immunpräzipitationen Unterschiede im Interaktionsverhalten von TAP-c-Abl<sup>wt</sup> und TAP-c-Abl<sup>T735A</sup> gezeigt werden, auf denen der Unterschied in der zellulären Wirkungsweise dieser beiden Proteine während einer *H. pylori*-Infektion basiert. Dies könnte weiteren Aufschluss über die Funktion der Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> in *H. pylori*-infizierten gastralen Epithelzellen geben.

Neben einer *H. pylori*-induzierten Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch PKC wurde in dieser Arbeit eine transiente Phosphorylierung an c-Abl<sup>T735</sup> durch konstitutiv-aktiviertes TTK beobachtet, die bereits in der Literatur in HeLa Zellen dokumentiert wurde (Nihira *et al.*, 2008) (Abb. 6.1 links, Schema in blauem Kreis). Im Zuge dieser Arbeit wurde ein TTK-Aktivitätsassay durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dieser lieferte jedoch keine verwertbaren Ergebnisse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten unter anderem auf eine negative Wirkung von *H. pylori* bezüglich der Aktivität von TTK hin, was eine Akkumulierung von c-Abl in den infizierten Zellen zur Folge zu haben scheint (Abb. 6.1 Mitte). Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Experimente und kann als ein initiales Experiment dienen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbott, A.(2005).**"Gut feeling secures medical Nobel for Australian doctors" *Nature*,7060,801.
- Abelson, H. T. and Rabstein, L. S. (1970).**"Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice" *Cancer Res.*,8,2213-2222.
- Advani, A. S. and Pendergast, A. M.(2002).**"Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects" *Leuk.Res.*,8,713-720.
- Akhiani, A. A., Pappo, J., Kabok, Z., Schon, K., Gao, W., Franzen, L. E., and Lycke, N.(2002).** "Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells" *J.Immunol.*,12,6977-6984.
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A., and Berg, D. E.(1998).**"Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*" *Mol.Microbiol.*,1,37-53.
- Allaker, R. P., Young, K. A., Hardie, J. M., Domizio, P., and Meadows, N. J.(2002).**"Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission" *J.Med.Microbiol.*,4,312-317.
- Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J., and Falkow, S.(2003).** "Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA" *Science*,5624,1430-1434.
- Amieva, M. R. and El Omar, E. M.(2008)** ."Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection" *Gastroenterology*,1,306-323.
- Appelmek, B. J., Negrini, R., Moran, A. P., and Kuipers, E. J.(1997).**"Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host" *Trends Microbiol.*,2,70-73.
- Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T., and Sasakawa, C.(2000).**"*Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells" *J.Exp.Med.*,4,593-602.
- Asahi, M., Tanaka, Y., Izumi, T., Ito, Y., Naiki, H., Kersulyte, D., Tsujikawa, K., Saito, M., Sada, K., Yanagi, S., Fujikawa, A., Noda, M., and Itokawa, Y.(2003).**"*Helicobacter pylori* CagA containing ITAM-like sequences localized to lipid rafts negatively regulates VacA-induced signaling in vivo" *Helicobacter.*,1,1-14.
- Ashktorab, H., Ahmed, A., Littleton, G., Wang, X. W., Allen, C. R., Tackey, R., Walters, C., and Smoot, D. T.(2003).**"p53 and p14 increase sensitivity of gastric cells to *H. pylori*-induced apoptosis" *Dig.Dis.Sci.*,7,1284-1291.
- Ashktorab, H., Dashwood, R. H., Dashwood, M. M., Zaidi, S. I., Hewitt, S. M., Green, W. R., Lee, E. L., Daremipouran, M., Nouraie, M., Malekzadeh, R., and Smoot, D. T.(2008).**"*H. pylori*-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria" *Helicobacter.*,6,506-517.
- Atherton, J. C., Tham, K. T., Peek, R. M., Jr., Cover, T. L., and Blaser, M. J.(1996).**"Density of *Helicobacter pylori* infection in vivo as assessed by quantitative culture and histology" *J.Infect.Dis.*,3,552-556.
- Atherton, J. C.(2006).**"The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases" *Annu.Rev.Pathol.*,63-96.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P. R., Naumann, M., and Meyer, T. F.(2000).**"Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus" *Cell Microbiol.*,2,155-164.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., and Meyer, T. F.(2001).**"Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells" *Mol.Microbiol.*,3,631-644.
- Backert, S. and Meyer, T. F.(2006).**"Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis" *Curr.Opin.Microbiol.*,2,207-217.
- Backert, S. and Selbach, M.(2008).**"Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis" *Cell Microbiol.*,8,1573-1581.
- Backert, S., Tegtmeyer, N., and Selbach, M.(2010).**"The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis" *Helicobacter.*,3,163-176.
- Bacon, D. J., Alm, R. A., Burr, D. H., Hu, L., Kopecko, D. J., Ewing, C. P., Trust, T. J., and Guerry, P.(2000).**"Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176" *Infect.Immun.*,8,4384-4390.
- Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., and Amieva, M. R.(2005).**"*Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*,45,16339-16344.
- Barila, D. and Superti-Furga, G.(1998).**"An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity" *Nat.Genet.*,3,280-282.
- Barila, D., Mangano, R., Gonfloni, S., Kretzschmar, J., Moro, M., Bohmann, D., and Superti-Furga, G. (2000).**"A nuclear tyrosine phosphorylation circuit: c-Jun as an activator and substrate of c-Abl and JNK" *EMBO J.*,2,273-281.
- Barila, D., Rufini, A., Condo, I., Ventura, N., Dorey, K., Superti-Furga, G., and Testi, R.(2003).**"Caspase-dependent cleavage of c-Abl contributes to apoptosis" *Mol.Cell Biol.*,8,2790-2799.
- Baskaran, R., Chiang, G. G., and Wang, J. Y.(1996).**"Identification of a binding site in c-Abl tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II" *Mol.Cell Biol.*,7,3361-3369.
- Ben Neriah, Y., Bernards, A., Paskind, M., Daley, G. Q., and Baltimore, D.(1986).**"Alternative 5' exons in c-abl mRNA" *Cell*,4,577-586.

- Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N., and Nomura, A. (1995).** "Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach" *Cancer Res.*, 10, 2111-2115.
- Blaser, M. J. and Atherton, J. C. (2004).** "*Helicobacter pylori* persistence: biology and disease" *J. Clin. Invest.*, 3, 321-333.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., and Normark, S. (1993).** "Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens" *Science*, 5141, 1892-1895.
- Botham, C. M., Wandler, A. M., and Guillemin, K. (2008).** "A transgenic *Drosophila* model demonstrates that the *Helicobacter pylori* CagA protein functions as a eukaryotic Gab adaptor" *PLoS Pathog.*, 5, e1000064.
- Bourzac, K. M., Botham, C. M., and Guillemin, K. (2007).** "*Helicobacter pylori* CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3" *Infect. Immun.*, 3, 1203-1213.
- Bradley, W. D. and Koleske, A. J. (2009).** "Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: emerging mechanisms and physiological contexts" *J. Cell Sci.*, Pt 19, 3441-3454.
- Brandt, S., Wessler, S., Hartig, R., and Backert, S. (2009).** "*Helicobacter pylori* activates protein kinase C delta to control Raf in MAP kinase signalling: role in AGS epithelial cell scattering and elongation" *Cell Motil. Cytoskeleton*, 10, 874-892.
- Brasher, B. B. and Van Etten, R. A. (2000).** "c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines" *J. Biol. Chem.*, 45, 35631-35637.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B. J., and Lydon, N. B. (1996).** "Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative" *Cancer Res.*, 1, 100-104.
- Buti, L., Spooner, E., Van der Veen, A. G., Rappuoli, R., Covacci, A., and Ploegh, H. L. (2011).** "*Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 22, 9238-9243.
- Calam, J. (1999).** "*Helicobacter pylori* modulation of gastric acid" *Yale J. Biol. Med.*, 2-3, 195-202.
- Cao, X., Tanis, K. Q., Koleske, A. J., and Colicelli, J. (2008).** "Enhancement of ABL kinase catalytic efficiency by a direct binding regulator is independent of other regulatory mechanisms" *J. Biol. Chem.*, 46, 31401-31407.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996).** "*cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 25, 14648-14653.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nunez, G., and Inohara, N. (2003).** "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid" *Nat. Immunol.*, 7, 702-707.
- Chan, L. C., Karhi, K. K., Rayter, S. I., Heisterkamp, N., Eridani, S., Powles, R., Lawler, S. D., Groffen, J., Foulkes, J. G., Greaves, M. F. (1987).** "A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia" *Nature*, 6105, 635-637.
- Chaturvedi, R., Cheng, Y., Asim, M., Bussiere, F. I., Xu, H., Gobert, A. P., Hacker, A., Casero, R. A., Jr., and Wilson, K. T. (2004).** "Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization" *J. Biol. Chem.*, 38, 40161-40173.
- Chen, G., Sordillo, E. M., Ramey, W. G., Reidy, J., Holt, P. R., Krajewski, S., Reed, J. C., Blaser, M. J., and Moss, S. F. (1997).** "Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, 626-632.
- Chen, L. T., Lin, J. T., Tai, J. J., Chen, G. H., Yeh, H. Z., Yang, S. S., Wang, H. P., Kuo, S. H., Sheu, B. S., Jan, C. M., Wang, W. M., Wang, T. E., Wu, C. W., Chen, C. L., Su, I. J., Whang-Peng, J., and Cheng, A. L. (2005).** "Long-term results of anti-*Helicobacter pylori* therapy in early-stage gastric high-grade transformed MALT lymphoma" *J. Natl. Cancer Inst.*, 18, 1345-1353.
- Ching, C. K., Wong, B. C., Kwok, E., Ong, L., Covacci, A., and Lam, S. K. (1996).** "Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls" *Am. J. Gastroenterol.*, 5, 949-953.
- Churin, Y., Kardalidou, E., Meyer, T. F., and Naumann, M. (2001).** "Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection" *Mol. Microbiol.*, 4, 815-823.
- Churin, Y., Al Ghouli, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W., and Naumann, M. (2003).** "*Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response" *J. Cell Biol.*, 2, 249-255.
- Cirak, M. Y., Akyon, Y., and Megraud, F. (2007).** "Diagnosis of *Helicobacter pylori*" *Helicobacter*, 4-9.
- Clark, S. S., McLaughlin, J., Crist, W. M., Champlin, R., and Witte, O. N. (1987).** "Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL" *Science*, 4784, 85-88.
- Clement, M. V. and Pervaiz, S. (1999).** "Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis" *Free Radic. Res.*, 4, 247-252.
- Colicelli, J. (2010).** "ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity" *Sci. Signal.*, 139, re6-
- Cong, F., Spencer, S., Cote, J. F., Wu, Y., Tremblay, M. L., Lasky, L. A., and Goff, S. P. (2000).** "Cytoskeletal protein PSTIP1 directs the PEST-type protein tyrosine phosphatase to the c-Abl kinase to mediate Abl dephosphorylation" *Mol. Cell*, 6, 1413-1423.
- Corradi, V., Mancini, M., Santucci, M. A., Carlomagno, T., Sanfelice, D., Mori, M., Vignaroli, G., Falchi, F., Manetti, F., Radi, M., and Botta, M. (2011).** "Computational techniques are valuable tools for the



discovery of protein-protein interaction inhibitors: the 14-3-3sigma case" *Bioorg.Med.Chem.Lett.*,22,6867-6871.

**Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., and .(1993).**"Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,12,5791-5795.

**Covacci, A. and Rappuoli, R.(1998).**"*Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasi-species" *Curr.Opin.Microbiol.*,1,96-102.

**Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R.(1999).**"*Helicobacter pylori* virulence and genetic geography" *Science*,5418, 1328-1333.

**Cover, T. L., Glupczynski, Y., Lage, A. P., Burette, A., Tummuru, M. K., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J.(1995).**"Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strains" *J.Clin.Microbiol.*,6,1496-1500.

**Cover, T. L., Krishna, U. S., Israel, D. A., and Peek, R. M., Jr.(2003).**"Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin" *Cancer Res.*,5,951-957.

**D'Ellos, M. M., Manghetti, M., De Carli, M., Costa, F., Baldari, C. T., Burroni, D., Telford, J. L., Romagnani, S., and Del Prete, G.(1997).**"T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease" *J.Immunol.*,2,962-967.

**Daley, G. Q., Van Etten, R. A., and Baltimore, D.(1990).**"Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome" *Science*,4944,824-830.

**Davies, G. R., Simmonds, N. J., Stevens, T. R., Sheaff, M. T., Banatvala, N., Laurenson, I. F., Blake, D. R., and Rampton, D. S.(1994).**"*Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo" *Gut*,2,179-185.

**Deininger, M. W., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J. M., and Melo, J. V.(2000).**"BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia" *Cancer Res.*,7,2049-2055.

**di Bari, M. G., Ciuffini, L., Mingardi, M., Testi, R., Soddu, S., and Barila, D.(2006).**"c-Abl acetylation by histone acetyltransferases regulates its nuclear-cytoplasmic localization" *EMBO Rep.*,7,727-733.

**Dikic, I., Szymkiewicz, I., and Soubeyran, P.(2003).**"Cbl signaling networks in the regulation of cell function" *Cell Mol.Life Sci.*,9,1805-1827.

**Drake, I. M., Mapstone, N. P., Schorah, C. J., White, K. L., Chalmers, D. M., Dixon, M. F., and Axon, A. T.(1998).**"Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis: relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of H pylori eradication" *Gut*,6,768-771.

**Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N. B.(1996).**"Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells" *Nat.Med.*,5,561-566.

**Dunn, B. E., Cohen, H., and Blaser, M. J.(1997).**"*Helicobacter pylori*" *Clin.Microbiol.Rev.*, 4,720-741.

**El Zaatari, M., Zavros, Y., Tessier, A., Waghray, M., Lentz, S., Gumucio, D., Todisco, A., and Merchant, J. L.(2010).**"Intracellular calcium release and protein kinase C activation stimulate sonic hedgehog gene expression during gastric acid secretion" *Gastroenterology*,6,2061-2071.

**Evans, D. J., Jr., Evans, D. G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H. C., Graham, D. Y., Granger, D. N., and Kvietys, P. R.(1995).**"Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein" *Infect.Immun.*,6, 2213-2220.

**Fan, P. D., Cong, F., and Goff, S. P.(2003).**"Homo- and hetero-oligomerization of the c-Abl kinase and Abelson-interactor-1" *Cancer Res.*,4,873-877.

**Feller, S. M., Knudsen, B., and Hanafusa, H.(1994)**"c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk" *EMBO J.*,10,2341-2351.

**Ferguson, D. A., Jr., Li, C., Patel, N. R., Mayberry, W. R., Chi, D. S., and Thomas, E.(1993).**"Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva" *J.Clin.Microbiol.*,10, 2802-2804.

**Ferguson,D.A., Jr., Jiang,C., Chi,D.S., Laffan,J.J., Li,C., and Thomas,E.(1999).** Evaluation of two string tests for obtaining gastric juice for culture, nested-PCR detection, and combined single- and double-stranded conformational polymorphism discrimination of *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.*, 44, 2056-2062.

**Fischer, W., Buhrdorf, R., Gerland, E., and Haas, R.(2001).**"Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*" *Infect.Immun.*,11,6769-6775.

**Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., and Haas, R.(2001).**"Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8" *Mol.Microbiol.*,5,1337-1348.

**Fox, J. G. and Wang, T. C.(2002).**"*Helicobacter pylori* infection: pathogenesis" *Curr.Opin.Gastroenterol.*,1,15-25.

**Franco, A. T., Israel, D. A., Washington, M. K., Krishna, U., Fox, J. G., Rogers, A. B., Neish, A. S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G. I., Hatakeyama, M., Whitehead, R., Gaus, K., O'Brien, D. P., Romero-Gallo, J., and Peek, R. M., Jr.(2005).**"Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*" *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*,30,10646-10651.

**Fronzes, R., Christie, P. J., and Waksman, G.(2009).**"The structural biology of type IV secretion systems" *Nat.Rev.Microbiol.*,10,703-714.

**Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J. C., Contamin, S., de, Thillot, V, Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E., and Boquet, P.(2000).**"The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release" *EMBO J.*,23,6361-6370.

**Girardin, S. E., Travassos, L. H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I. G., Philpott, D. J., Sansonetti, P. J., and Mengin-Lecreulx, D.(2003).**"Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2" *J.Biol.Chem.*,43,41702-41708.

- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J.(2003).**"Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan" *Science*,5625,1584-1587.
- Goga, A., Liu, X., Hambuch, T. M., Senechal, K., Major, E., Berk, A. J., Witte, O. N., and Sawyers, C. L.(1995).**"p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase" *Oncogene*,4,791-799.
- Goldman, J. M. and Melo, J. V.(2003).**"Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment" *N.Engl.J.Med.*,15,1451-1464.
- Graham, D. Y.(2000).**"Community acquired acute *Helicobacter pylori* gastritis" *J.Gastroenterol.Hepatol.*,12,1353-1355.
- Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., and Grosveld, G.(1984).**"Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22" *Cell*,1,93-99.
- Gupta, R. A., Polk, D. B., Krishna, U., Israel, D. A., Yan, F., DuBois, R. N., and Peek, R. M., Jr.(2001).**"Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells" *J.Biol.Chem.*,33,31059-31066.
- Hall, P. A., Coates, P. J., Ansari, B., and Hopwood, D.(1994).**"Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis" *J.Cell Sci.*,3569-3577.
- Hanks, S. K.(2003).**"Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective" *Genome Biol.*,5,111-
- Hantschel, O. and Superti-Furga, G.(2004).**"Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases" *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*,1,33-44.
- Harris, A. G., Hinds, F. E., Beckhouse, A. G., Kolesnikow, T., and Hazell, S. L.(2002).**"Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874)" *Microbiology*,Pt 12,3813-3825.
- Harris, P. R., Mobley, H. L., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., and Smith, P. D.(1996).**"*Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production" *Gastroenterology*,2,419-425.
- Hatakeyama, M.(2003) A.**"*Helicobacter pylori* CagA as a potential bacterial oncoprotein in gastric carcinogenesis" *Pathol.Biol.(Paris)*,7,393-394.
- Hatakeyama, M.(2003) B.**"*Helicobacter pylori* CagA--a potential bacterial oncoprotein that functionally mimics the mammalian Gab family of adaptor proteins" *Microbes.Infect.*,2,143-150.
- Hatakeyama, M.(2004).**"*Helicobacter pylori* causes gastric cancer by hijacking cell growth signaling" *Discov.Med.*,24,476-481.
- Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J. R., Spurr, N. K., Goodfellow, P. N., Solomon, E., Carritt, B., and Bodmer, W. F.(1982).**"Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes" *Nature*,5885,747-749.
- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., and Grosveld, G.(1985).**"Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation" *Nature*,6022,758-761.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M.(2002).**"SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein" *Science*,5555,683-686.
- Hirschl, A. M.(1994).**"[*Helicobacter pylori*: pathogens, pathomechanisms and epidemiology]" *Wien.Klin.Wochenschr.*,17,538-542.
- Hoy, B.(2008).**"Identifizierung von c-Abl- Interaktionspartnern in *Helicobacter pylori*-infizierten Epithelzellen"Diplomarbeit.
- IARC(1994).**"Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994" *IARC Monogr Eval.Carcinog.Risks Hum.*,1-241.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., and Boren, T.(1998).**"*Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging" *Science*,5349,373-377.
- Ito, Y., Pandey, P., Mishra, N., Kumar, S., Narula, N., Kharbanda, S., Saxena, S., and Kufe, D.(2001).**"Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis" *Mol.Cell Biol.*,18,6233-6242.
- Jang, T. J. and Kim, J. R.(2000).**"Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*" *J.Gastroenterol.*,4,265-271.
- Jelluma, N., Brenkman, A. B., van den Broek, N. J., Crujssen, C. W., van Osch, M. H., Lens, S. M., Medema, R. H., and Kops, G. J.(2008).**"Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment" *Cell*,2,233-246.
- Jin, H. and Wang, J. Y.(2007).**"Abl tyrosine kinase promotes dorsal ruffles but restrains lamellipodia extension during cell spreading on fibronectin" *Mol.Biol.Cell*,10,4143-4154.
- Kabir, S.(2004).**"Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review" *Helicobacter.*,2,115-123.
- Kang, J., Chen, Y., Zhao, Y., and Yu, H.(2007).**"Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*,51,20232-20237.
- Kawahara, T., Teshima, S., Kuwano, Y., Oka, A., Kishi, K., and Rokutan, K.(2001).**"*Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells" *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*,3,G726-G734.
- Kharbanda, S., Yuan, Z. M., Weichselbaum, R., and Kufe, D.(1998).**"Determination of cell fate by c-Abl

- activation in the response to DNA damage"  
*Oncogene*,25,3309-3318.
- Kim, S., Chamberlain, A. K., and Bowie, J. U.(2004).**"Membrane channel structure of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin: role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels"  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,16,5988-5991.
- Kimura, S., Inoue, H., Sato, Y., Aoyama, Y., Shimojima, M., Masuyama, T., and Kudo, S. E.(2006).**"Ex vivo visualization of *Helicobacter pylori* using an endocytoscopic probe" *Biomed.Res.*,5,255-257.
- Kipreos, E. T. and Wang, J. Y.(1992).**"Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA" *Science*,5055,382-385.
- Koleske, A. J., Gifford, A. M., Scott, M. L., Nee, M., Bronson, R. T., Miczek, K. A., and Baltimore, D.(1998).**"Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation" *Neuron*,6,1259-1272.
- Konopka, J. B., Watanabe, S. M., and Witte, O. N. (1984).**"An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity" *Cell*,3,1035-1042.
- Konturek, P. C., Konturek, S. J., Pierzchalski, P., Bielanski, W., Duda, A., Marlicz, K., Starzynska, T., and Hahn, E. G.(2001).**"Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach--role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases" *Med.Sci.Monit.*,5,1092-1107.
- Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P. H., Stremmel, W., and Rudi, J.(2001).**"Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS" *Infect.Immun.*,8,5080-5087.
- Kufe, D., Inghirami, G., Abe, M., Hayes, D., Justi-Wheeler, H., and Schlom, J.(1984).**"Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors" *Hybridoma*,3,223-232.
- Kuipers, E. J., Uytterlinde, A. M., Pena, A. S., Hazenberg, H. J., Bloemena, E., Lindeman, J., Klinkenberg-Knol, E. C., and Meuwissen, S. G.(1995).**"Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety" *Am.J.Gastroenterol.*,9,1401-1406.
- Kuipers, E. J., Thijs, J. C., and Festen, H. P.(1995).**"The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease" *Aliment.Pharmacol.Ther.*,59-69.
- Kuo, C. H. and Wang, W. C.(2003).**"Binding and internalization of *Helicobacter pylori* VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells" *Biochem.Biophys.Res.Comm.*,2,640-644.
- Kurzrock, R., Shtalrid, M., Romero, P., Kloetzer, W. S., Talpas, M., Trujillo, J. M., Blick, M., Beran, M., and Guterman, J. U.(1987).**"A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia" *Nature*,6105,631-635.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H., and Kuipers, E. J.(2006).**"Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection" *Clin.Microbiol.Rev.*,3,449-490.
- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., Konig, W., and Backert, S.(2007).**"*Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation" *Nature*,7164,862-866.
- Laemmli,U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lapetina, S., Mader, C. C., Machida, K., Mayer, B. J., and Koleske, A. J.(2009).**"Arg interacts with cortactin to promote adhesion-dependent cell edge protrusion" *J.Cell Biol.*,3,503-519.
- Lasitschka, Bärbel.(2007).**"Exprimierung von TAP-tagged c-Abl Fragmenten in H. pylori infizierten MCF-7 Zellen" *Forschungspraktikum*.
- Le'Negrate, G., Selva, E., Auberger, P., Rossi, B., and Hofman, P.(2000).**"Sustained polymorphonuclear leukocyte transmigration induces apoptosis in T84 intestinal epithelial cells" *J.Cell Biol.*,6,1479-1488.
- Leung, W. K., Siu, K. L., Kwok, C. K., Chan, S. Y., Sung, R., and Sung, J. J.(1999).**"Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission" *Am.J.Gastroenterol.*,10,2881-2884.
- Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., and Morgan, D. R.(1988).**"Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*" *J.Med.Microbiol.*,2,93-99.
- Lewis, J. M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M. A., and Wang, J. Y.(1996).**"Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,26,15174-15179.
- Ligtenberg, M. J., Kruijshaar, L., Buijs, F., van Meijer, M., Litvinov, S. V., and Hilken, J.(1992).**"Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor" *J.Biol.Chem.*,9,6171-6177.
- Liu, Z. G., Baskaran, R., Lea-Chou, E. T., Wood, L. D., Chen, Y., Karin, M., and Wang, J. Y.(1996).**"Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress" *Nature*,6606,273-276.
- Lupetti, P., Heuser, J. E., Manetti, R., Massari, P., Lanzavecchia, S., Bellon, P. L., Dallai, R., Rappuoli, R., and Telford, J. L.(1996).**"Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin" *J.Cell Biol.*,4,801-807.
- Machuy, N., Rajalingam, K., and Rudel, T.(2004).**"Requirement of caspase-mediated cleavage of c-Abl during stress-induced apoptosis" *Cell Death.Differ.*,3,290-300.
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K. E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B. B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L., and Boren, T.(2002).**"*Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation" *Science*,5581,573-578.
- Malaty, H. M. and Graham, D. Y.(1994).**"Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection" *Gut*,6,742-745.

- Mancini, M., Veljkovic, N., Corradi, V., Zuffa, E., Corrado, P., Pagnotta, E., Martinelli, G., Barbieri, E., and Santucci, M. A. (2009).** "14-3-3 ligand prevents nuclear import of c-ABL protein in chronic myeloid leukemia" *Traffic*, 6, 637-647.
- Mancini, M., Corradi, V., Petta, S., Barbieri, E., Manetti, F., Botta, M., and Santucci, M. A. (2011).** "A new nonpeptidic inhibitor of 14-3-3 induces apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia sensitive or resistant to imatinib" *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 3, 596-604.
- Mandil, R., Ashkenazi, E., Blass, M., Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Rosenthal, G., Umansky, F., Lorenzo, P. S., Blumberg, P. M., and Brodie, C. (2001).** "Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells" *Cancer Res.*, 11, 4612-4619.
- Marshall, B. J. and Warren, J. R. (1984).** "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration" *Lancet*, 8390, 1311-1315.
- Marshall, B. J., McGeachie, D. B., Rogers, P. A., and Glancy, R. J. (1985) A.** "Pyloric Campylobacter infection and gastroduodenal disease" *Med.J.Aust.*, 8, 439-444.
- Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. B., and Glancy, R. J. (1985) B.** "Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter" *Med.J.Aust.*, 8, 436-439.
- McGee, D. J. and Mobley, H. L. (1999).** "Mechanisms of Helicobacter pylori infection: bacterial factors" *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 155-180.
- McWhirter, J. R. and Wang, J. Y. (1991).** "Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins" *Mol.Cell Biol.*, 3, 1553-1565.
- McWhirter, J. R. and Wang, J. Y. (1993).** "An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias" *EMBO J.*, 4, 1533-1546.
- Megraud, F. and Lamouliatte, H. (2003).** "Review article: the treatment of refractory Helicobacter pylori infection" *Aliment.Pharmacol.Ther.*, 11, 1333-1343.
- Melo, J. V. (1996).** "The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype" *Blood*, 7, 2375-2384.
- Weydig, C. (2009).** "Untersuchungen zum Mechanismus der Helicobacter pylori -induzierten Auflösung epithelialer Zelladhäsion" *Dissertation*.
- Mhawech, P. (2005).** "14-3-3 proteins--an update" *Cell Res.*, 4, 228-236.
- Miller, A. L., Wang, Y., Mooseker, M. S., and Koleske, A. J. (2004).** "The Abl-related gene (Arg) requires its F-actin-microtubule cross-linking activity to regulate lamellipodial dynamics during fibroblast adhesion" *J.Cell Biol.*, 3, 407-419.
- Mimuro, H., Suzuki, T., Tanaka, J., Asahi, M., Haas, R., and Sasakawa, C. (2002).** "Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities" *Mol.Cell*, 4, 745-755.
- Miyoshi-Akiyama, T., Aleman, L. M., Smith, J. M., Adler, C. E., and Mayer, B. J. (2001).** "Regulation of Cbl phosphorylation by the Abl tyrosine kinase and the Nck SH2/SH3 adaptor" *Oncogene*, 30, 4058-4069.
- Moese, S., Selbach, M., Kwok, T., Brinkmann, V., König, W., Meyer, T. F., and Backert, S. (2004).** "Helicobacter pylori induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways" *Infect.Immun.*, 6, 3646-3649.
- Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., Karlas, A., Haimovich, B., Backert, S., and Meyer, T. F. (2007).** "The Helicobacter pylori CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin" *Cell Microbiol.*, 5, 1148-1161.
- Mojtahedi, A., Salehi, R., Navabakbar, F., Tamizifar, H., Tavakkoli, H., and Duronio, V. (2007).** "Evaluation of apoptosis induction using PARP cleavage on gastric adenocarcinoma and fibroblast cell lines by different strains of Helicobacter pylori" *Pak.J.Biol.Sci.*, 22, 4097-4102.
- Molinari, M., Galli, C., Norais, N., Telford, J. L., Rappuoli, R., Luzio, J. P., and Montecucco, C. (1997).** "Vacuoles induced by Helicobacter pylori toxin contain both late endosomal and lysosomal markers" *J.Biol.Chem.*, 40, 25339-25344.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C. (1998).** "Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA" *J.Exp.Med.*, 1, 135-140.
- Moran, A. P., Lindner, B., and Walsh, E. J. (1997).** "Structural characterization of the lipid A component of Helicobacter pylori rough- and smooth-form lipopolysaccharides" *J.Bacteriol.*, 20, 6453-6463.
- Morris, A. and Nicholson, G. (1987).** "Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH" *Am.J.Gastroenterol.*, 3, 192-199.
- Morris, A. J., Ali, M. R., Nicholson, G. I., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J. (1991).** "Long-term follow-up of voluntary ingestion of Helicobacter pylori" *Ann.Intern.Med.*, 8, 662-663.
- Moss, S. F., Sordillo, E. M., Abdalla, A. M., Makarov, V., Hanzely, Z., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., and Holt, P. R. (2001).** "Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with cagA + Helicobacter pylori strains" *Cancer Res.*, 4, 1406-1411.
- Mueller, D., Tegtmeyer, N., Brandt, S., Yamaoka, Y., De Poire, E., Sgouras, D., Wessler, S., Torres, J., Smolka, A., and Backert, S. (2012).** "c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian Helicobacter pylori strains" *J.Clin.Invest*, 4, 1553-1566.
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R. M., Jr., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2007).** "Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells" *Oncogene*, 32, 4617-4626.
- Nagar, B., Bornmann, W. G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D. R., Miller, W. T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2002).** "Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)" *Cancer Res.*, 15, 4236-4243.

- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J.(2003).**"Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase" *Cell*,6,859-871.
- Nagase, L., Murata-Kamiya, N., and Hatakeyama, M.(2011).**"Potentiation of Helicobacter pylori CagA protein virulence through homodimerization" *J.Biol.Chem.*,38,33622-33631.
- Nagata, K., Yu, H., Nishikawa, M., Kashiba, M., Nakamura, A., Sato, E. F., Tamura, T., and Inoue, M.(1998).**"Helicobacter pylori generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism" *J.Biol.Chem.*,23,14071-14073.
- Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoe, K., Yamazaki, S., Azuma, T., and Hatakeyama, M.(2006).**"Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of Helicobacter pylori CagA" *Gastroenterology*,4,1181-1190.
- Nicholson, , D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle and M., Lazebnik, Y. A., (1995).**"Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis" *Nature*,6535,37-43.
- Nihira, K., Taira, N., Miki, Y., and Yoshida, K.(2008).**"TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14-3-3-coupled phosphorylation in response to oxidative stress" *Oncogene*,58,7285-7295.
- Nowell, P. C. and Hungerford, D. A.(1960).**"Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes" *J.Natl.Cancer Inst.*,85-109.
- Obst, B., Schutz, S., Ledig, S., Wagner, S., and Beil, W.(2002).**"Helicobacter pylori -induced apoptosis in gastric epithelial cells is blocked by protein kinase C activation" *Microb.Pathog.*,4,167-175.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R.(2000).**"Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion" *Science*,5457,1497-1500.
- Odenbreit, S., Faller, G., and Haas, R.(2002).**"Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of Helicobacter pylori to human gastric tissue" *Int.J.Med.Microbiol.*,3-4,247-256.
- Olczak, A. A., Seyler, R. W., Jr., Olson, J. W., and Maier, R. J.(2003).**"Association of Helicobacter pylori antioxidant activities with host colonization proficiency" *Infect.Immun.*,1,580-583.
- Papini, E., Satin, B., Norais, N., de Bernard, M., Telford, J. L., Rappuoli, R., and Montecucco, C.(1998).**"Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by Helicobacter pylori vacuolating toxin" *J.Clin.Invest*,4,813-820.
- Parkin, D. M.(2001).**"Global cancer statistics in the year 2000" *Lancet Oncol.*,9,533-543.
- Parkin, D. M.(2004).**"International variation" *Oncogene*,38,6329-6340.
- Parsonnet, J.(1998).**"Helicobacter pylori: the size of the problem" *Gut*,S6-S9.
- Parsonnet, J., Shmueli, H., and Haggerty, T.(1999).**"Fecal and oral shedding of Helicobacter pylori from healthy infected adults" *JAMA*,23,2240-2245.
- Parsons, J. T., Martin, K. H., Slack, J. K., Taylor, J. M., and Weed, S. A.(2000).**"Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement" *Oncogene*,49,5606-5613.
- Peacock, J. G., Couch, B. A., and Koleske, A. J.(2010).**"The Abl and Arg non-receptor tyrosine kinases regulate different zones of stress fiber, focal adhesion, and contractile network localization in spreading fibroblasts" *Cytoskeleton (Hoboken.)*,10,666-675.
- Peek, R. M., Jr., Thompson, S. A., Donahue, J. P., Tham, K. T., Atherton, J. C., Blaser, M. J., and Miller, G. G.(1998).**"Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a Helicobacter pylori gene, iceA, that is associated with clinical outcome" *Proc.Assoc.Am.Physicians*,6,531-544.
- Peek, R. M., Jr. and Blaser, M. J.(2002).**"Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas" *Nat.Rev.Cancer*,1,28-37.
- Peek, R. M., Jr.(2005).**"Pathogenesis of Helicobacter pylori infection" *Springer Semin.Immunopathol.*,2,197-215.
- Pendergast, A. M.(2002).**"The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling" *Adv.Cancer Res.*,51-100.
- Pierzchalski, P., Pytko-Polonczyk, J., Jaworek, J., Konturek, S. J., and Gonciarz, M.(2009).**"Only live Helicobacter pylori is capable of caspase-3 dependent apoptosis induction in gastric mucosa epithelial cells" *J.Physiol Pharmacol.*,4,119-128.
- Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K. A., Kazlauskas, A., and Pendergast, A. M.(1999).**"c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF" *Genes Dev.*,18,2400-2411.
- Pluk, H., Dorey, K., and Superti-Furga, G.(2002).**"Autoinhibition of c-Abl" *Cell*,2,247-259.
- Poppe, M., Feller, S. M., Romer, G., and Wessler, S.(2007).**"Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility" *Oncogene*,24,3462-3472.
- Poppe, M.(2008).** "Analyse der Funktion der Nicht-Rezeptortyrosinkinase in Helicobacter pylori-infizierten Epithelzellen", Dissertation.
- Radha, V., Rajanna, A., Mitra, A., Rangaraj, N., and Swarup, G.(2007).**"C3G is required for c-Abl-induced filopodia and its overexpression promotes filopodia formation" *Exp.Cell Res.*,11,2476-2492.
- Raina, D., Pandey, P., Ahmad, R., Bharti, A., Ren, J., Kharbada, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D.(2005).**"c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage" *J.Biol.Chem.*,12,11147-11151.
- Raina, D., Ahmad, R., Kumar, S., Ren, J., Yoshida, K., Kharbada, S., and Kufe, D.(2006).**"MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage" *EMBO J.*,16,3774-3783.
- Raitano, A. B., Whang, Y. E., and Sawyers, C. L.(1997).**"Signal transduction by wild-type and

leukemogenic Abl proteins"  
*Biochim.Biophys.Acta*,3,F201-F216.

**Ren, J., Agata, N., Chen, D., Li, Y., Yu, W. H., Huang, L., Raina, D., Chen, W., Kharbanda, S., and Kufe, D.(2004).**"Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents" *Cancer Cell*,2,163-175.

**Ren, J., Bharti, A., Raina, D., Chen, W., Ahmad, R., and Kufe, D.(2006).**"MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90" *Oncogene*,1,20-31.

**Ricci, V., Ciacci, C., Zarrilli, R., Sommi, P., Tummuru, M. K., Del Vecchio, Blanco C., Bruni, C. B., Cover, T. L., Blaser, M. J., and Romano, M.(1996).**"Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA" *Infect.Immun.*,7,2829-2833.

**Ricci, V., Galmiche, A., Doye, A., Necchi, V., Solcia, E., and Boquet, P.(2000).**"High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis" *Mol.Biol.Cell*,11,3897-3909.

**Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R.(2003).**"Cell migration: integrating signals from front to back" *Science*,5651,1704-1709.

**Rowley, J. D.(1973).**"Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining" *Nature*,5405,290-293.

**Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von Herbay, A., Mariani, S. M., Krammer, P. H., Galle, P. R., and Stremmel, W.(1998).**"Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis" *J.Clin.Invest*,8,1506-1514.

**Ruiz, B., Rood, J. C., Fontham, E. T., Malcom, G. T., Hunter, F. M., Sobhan, M., Johnson, W. D., and Correa, P.(1994).**"Vitamin C concentration in gastric juice before and after anti-*Helicobacter pylori* treatment" *Am.J.Gastroenterol.*,4,533-539.

**Sachs, G., Scott, D., Weeks, D., and Melchers, K.(2000).**"Gastric habitation by *Helicobacter pylori*: insights into acid adaptation" *Trends Pharmacol.Sci.*,11,413-416.

**Saglio, G., Pane, F., Martinelli, G., and Guerrasio, A.(1997).**"BCR/ABL transcripts and leukemia phenotype: an unsolved puzzle" *Leuk.Lymphoma*,3-4,281-286.

**Satin, B., Norais, N., Telford, J., Rappuoli, R., Murgia, M., Montecucco, C., and Papini, E.(1997).**"Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation" *J.Biol.Chem.*,40,25022-25028.

**Schmitt, W. and Haas, R.(1994).**"Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein" *Mol.Microbiol.*,2,307-319.

**Schneider, S.(2007).**"Charakterisierung der Threonin-Phosphorylierung von c-Abl in *Helicobacter pylori* infizierten Epithelzellen"Diplomarbeit.

**Schneider, S., Weydig, C., and Wessler, S.(2008).**"Targeting focal adhesions:*Helicobacter pylori*-host communication in cell migration" *Cell Commun.Signal.*,2.

**Schneider, S., Carra, G., Sahin, U., Hoy, B., Rieder, G., and Wessler, S.(2011).**"Complex cellular responses of *Helicobacter pylori*-colonized gastric adenocarcinoma cells" *Infect.Immun.*,6,2362-2371.

**Schraw, W., Li, Y., McClain, M. S., van der Goot, F. G., and Cover, T. L.(2002).**"Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts" *J.Biol.Chem.*,37,34642-34650.

**Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., Josenhans, C., and Suerbaum, S.(2004).**"The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*,14,5024-5029.

**Schulte, R. J. and Sefton, B. M.(2003).**"Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein" *Biochemistry*,31,9424-9430.

**Schultze, V., Hackelsberger, A., Gunther, T., Miehke, S., Roessner, A., and Malfertheiner, P.(1998).**"Differing patterns of *Helicobacter pylori* gastritis in patients with duodenal, prepyloric, and gastric ulcer disease" *Scand.J.Gastroenterol.*,2,137-142.

**Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L. S.(1999).**"Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*,25,14559-14564.

**Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F., and Backert, S.(2002).**"Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo" *J.Biol.Chem.*,9,6775-6778.

**Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C. R., Meyer, T. F., and Backert, S.(2003).**"The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation" *EMBO J.*,3,515-528.

**Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P. R., and Meyer, T. F.(2004).**"The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin" *Proteomics.*,10,2961-2968.

**Selbach, M., Paul, F. E., Brandt, S., Guye, P., Daumke, O., Backert, S., Dehio, C., and Mann, M.(2009).**"Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins" *Cell Host.Microbe*,4,397-403.

**Sewald, X., Jimenez-Soto, L., and Haas, R.(2011).**"PKC-dependent endocytosis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in primary T lymphocytes" *Cell Microbiol.*,3,482-496.

**Seyler, R. W., Jr., Olson, J. W., and Maier, R. J.(2001).**"Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization" *Infect.Immun.*,6,4034-4040.

**Shafman, T., Khanna, K. K., Kedar, P., Spring, K., Kozlov, S., Yen, T., Hobson, K., Gatei, M., Zhang, N., Watters, D., Egerton, M., Shiloh, Y., Kharbanda, S., Kufe, D., and Lavin, M. F.(1997).**"Interaction between

ATM protein and c-Abl in response to DNA damage" *Nature*, 6632, 520-523.

**Shaul, Y.(2000).**"c-Abl: activation and nuclear targets" *Cell Death.Differ.*, 1, 10-16.

**Shepherd, P., Suffolk, R., Halsey, J., and Allan, N.(1995).**"Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival" *Br.J.Haematol.*, 3, 546-554.

**Shirin, H., Sordillo, E. M., Oh, S. H., Yamamoto, H., Delohery, T., Weinstein, I. B., and Moss, S. F.(1999).**"Helicobacter pylori inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells" *Cancer Res.*, 10, 2277-2281.

**Sinha, S. K., Martin, B., Gold, B. D., Song, Q., Sargent, M., and Bernstein, C. N.(2004).**"The incidence of Helicobacter pylori acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parent-to-child transmission" *Helicobacter.*, 1, 59-68.

**Sionov, R. V., Coen, S., Goldberg, Z., Berger, M., Bercovich, B., Ben Neriah, Y., Ciechanover, A., and Haupt, Y.(2001).**"c-Abl regulates p53 levels under normal and stress conditions by preventing its nuclear export and ubiquitination" *Mol.Cell Biol.*, 17, 5869-5878.

**Smith, J. M., Katz, S., and Mayer, B. J.(1999).**"Activation of the Abl tyrosine kinase in vivo by Src homology 3 domains from the Src homology 2/Src homology 3 adaptor Nck" *J.Biol.Chem.*, 39, 27956-27962.

**Smythies, L. E., Waites, K. B., Lindsey, J. R., Harris, P. R., Ghiara, P., and Smith, P. D.(2000).**"Helicobacter pylori-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice" *J.Immunol.*, 2, 1022-1029.

**Sobala, G. M., Schorah, C. J., Shires, S., Lynch, D. A., Gallacher, B., Dixon, M. F., and Axon, A. T.(1993).**"Effect of eradication of Helicobacter pylori on gastric juice ascorbic acid concentrations" *Gut*, 8, 1038-1041.

**Srinivasan, D., Kaetzel, D. M., and Plattner, R.(2009).**"Reciprocal regulation of Abl and receptor tyrosine kinases" *Cell Signal.*, 7, 1143-1150.

**Stein, M., Rappuoli, R., and Covacci, A.(2000).**"Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation" *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.*, 3, 1263-1268.

**Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W. J., and Covacci, A.(2002).**"c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs" *Mol.Microbiol.*, 4, 971-980.

**Stingl, K., Altendorf, K., and Bakker, E. P.(2002).**"Acid survival of Helicobacter pylori: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?" *Trends Microbiol.*, 2, 70-74.

**Stuart, J. R., Gonzalez, F. H., Kawai, H., and Yuan, Z. M.(2006).**"c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading" *J.Biol.Chem.*, 42, 31290-31297.

**Suerbaum, S.(1995).**"The complex flagella of gastric Helicobacter species" *Trends Microbiol.*, 5, 168-170.

**Sun, X., Majumder, P., Shioya, H., Wu, F., Kumar, S., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., and Kufe, D.(2000).**"Activation of the cytoplasmic c-Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species" *J.Biol.Chem.*, 23, 17237-17240.

**Superti-Furga, G. and Courtneidge, S. A.(1995).**"Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases" *Bioessays*, 4, 321-330.

**Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T., and Sasakawa, C.(2005).**"Interaction of CagA with Crk plays an important role in Helicobacter pylori-induced loss of gastric epithelial cell adhesion" *J.Exp.Med.*, 9, 1235-1247.

**Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J. L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and Zoratti, M.(1999).**"Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of Helicobacter pylori is required for its biological activity" *EMBO J.*, 20, 5517-5527.

**Taagepera, S., McDonald, D., Loeb, J. E., Whitaker, L. L., McElroy, A. K., Wang, J. Y., and Hope, T. J.(1998).**"Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 13, 7457-7462.

**Tammer, I., Brandt, S., Hartig, R., Konig, W., and Backert, S.(2007).**"Activation of Abl by Helicobacter pylori: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering" *Gastroenterology*, 4, 1309-1319.

**Tegtmeyer, N., Hartig, R., Delahay, R. M., Rohde, M., Brandt, S., Conradi, J., Takahashi, S., Smolka, A. J., Sewald, N., and Backert, S.(2010).**"A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation" *J.Biol.Chem.*, 30, 23515-23526.

**Telford, J. L., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burrone, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z., and .(1994).**"Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease" *J.Exp.Med.*, 5, 1653-1658.

**Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M., and Hatakeyama, M.(2003).**"Attenuation of Helicobacter pylori CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase" *J.Biol.Chem.*, 6, 3664-3670.

**Tsutsumi, R., Takahashi, A., Azuma, T., Higashi, H., and Hatakeyama, M.(2006).**"Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with Helicobacter pylori CagA" *Mol.Cell Biol.*, 1, 261-276.

**Tummuru, M. K., Cover, T. L., and Blaser, M. J.(1993).**"Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production" *Infect.Immun.*, 5, 1799-1809.

**Van Der Weyden, M. B., Armstrong, R. M., and Gregory, A. T.(2005).**"The 2005 Nobel Prize in physiology or medicine" *Med.J.Aust.*, 11-12, 612-614.

**Van Etten, R. A., Jackson, P., and Baltimore, D.(1989).**"The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization" *Cell*, 4, 669-678.

**Van Etten, R. A., Jackson, P. K., Baltimore, D., Sanders, M. C., Matsudaira, P. T., and Janmey, P. A.(1994).**"The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity" *J.Cell Biol.*, 3, 325-340.

- Van Etten, R. A. (1999).** "Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl" *Trends Cell Biol.*, 5,179-186.
- Vermeer, P. D., Einwalter, L. A., Moninger, T. O., Rokhlina, T., Kern, J. A., Zabner, J., and Welsh, M. J. (2003).** "Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor" *Nature*, 6929,322-326.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J., and Ferrero, R. L. (2004).** "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island" *Nat. Immunol.*, 11,1166-1174.
- Vogel, J. P., Andrews, H. L., Wong, S. K., and Isberg, R. R. (1998).** "Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*" *Science*, 5352,873-876.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000).** "Surfing the p53 network" *Nature*, 6810,307-310.
- Wagner, S., Beil, W., Westermann, J., Logan, R. P., Bock, C. T., Trautwein, C., Bleck, J. S., and Manns, M. P. (1997).** "Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis" *Gastroenterology*, 6,1836-1847.
- Walker, A. J., Lacchini, A. H., Sealey, K. L., Mackintosh, D., and Davies, A. J. (2010).** "Spreading by snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells is regulated through integrated PKC, FAK and Src signalling" *Cell Tissue Res.*, 1,131-145.
- Wang, F., Xia, P., Wu, F., Wang, D., Wang, W., Ward, T., Liu, Y., Aikhionbare, F., Guo, Z., Powell, M., Liu, B., Bi, F., Shaw, A., Zhu, Z., Elmoselhi, A., Fan, D., Cover, T. L., Ding, X., and Yao, X. (2008).** "*Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells" *J. Biol. Chem.*, 39,26714-26725.
- Weel, J. F., van der Hulst, R. W., Gerrits, Y., Roorda, P., Feller, M., Dankert, J., Tytgat, G. N., and van der, Ende A. (1996).** "The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases" *J. Infect. Dis.*, 5,1171-1175.
- Welch, P. J. and Wang, J. Y. (1993).** "A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle" *Cell*, 4,779-790.
- Wen, S. T., Jackson, P. K., and Van Etten, R. A. (1996).** "The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products" *EMBO J.*, 7,1583-1595.
- Wen, Y., Marcus, E. A., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., Scott, D. R., and Sachs, G. (2003).** "Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*" *Infect. Immun.*, 10,5921-5939.
- Wessler, S., Hocker, M., Fischer, W., Wang, T. C., Rosewicz, S., Haas, R., Wiedenmann, B., Meyer, T. F., and Naumann, M. (2000).** "*Helicobacter pylori* activates the histidine decarboxylase promoter through a mitogen-activated protein kinase pathway independent of pathogenicity island-encoded virulence factors." *J. Biol. Chem.*, 275, 3629-3636.
- Wetzler, M., Talpaz, M., Van Etten, R. A., Hirsh-Ginsberg, C., Beran, M., and Kurzrock, R. (1993).** "Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation" *J. Clin. Invest.*, 4,1925-1939.
- Winans, S. C., Burns, D. L., and Christie, P. J. (1996).** "Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules" *Trends Microbiol.*, 2,64-68.
- Woodring, P. J., Hunter, T., and Wang, J. Y. (2001).** "Inhibition of c-Abl tyrosine kinase activity by filamentous actin" *J. Biol. Chem.*, 29,27104-27110.
- Woodring, P. J., Litwack, E. D., O'Leary, D. D., Lucero, G. R., Wang, J. Y., and Hunter, T. (2002).** "Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension" *J. Cell Biol.*, 5,879-892.
- Woodring, P. J., Hunter, T., and Wang, J. Y. (2003).** "Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases" *J. Cell Sci.*, Pt 13,2613-2626.
- Woodring, P. J., Meisenholder, J., Johnson, S. A., Zhou, G. L., Field, J., Shah, K., Bladt, F., Pawson, T., Niki, M., Pandolfi, P. P., Wang, J. Y., and Hunter, T. (2004).** "c-Abl phosphorylates Dok1 to promote filopodia during cell spreading" *J. Cell Biol.*, 4,493-503.
- Woodward, M., Morrison, C., and McColl, K. (2000).** "An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection" *J. Clin. Epidemiol.*, 2,175-181.
- Wu, I. C., Wu, M. T., Chen, Y. K., Hsu, M. C., Chou, S. H., Lee, C. H., Shiea, J. T., Wu, I. L., Huang, C. T., and Wu, D. C. (2008).** "Apoptotic effect of *Helicobacter pylori* on oesophageal squamous-cell carcinoma cells in vitro" *Eur. J. Clin. Invest.*, 10,760-765.
- Xia, H. H. and Talley, N. J. (2001).** "Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis" *Am. J. Gastroenterol.*, 1,16-26.
- Xu, H., Chaturvedi, R., Cheng, Y., Bussiere, F. I., Asim, M., Yao, M. D., Potosky, D., Meltzer, S. J., Rhee, J. G., Kim, S. S., Moss, S. F., Hacker, A., Wang, Y., Casero, R. A., Jr., and Wilson, K. T. (2004).** "Spermine oxidation induced by *Helicobacter pylori* results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis" *Cancer Res.*, 23,8521-8525.
- Yamaoka, Y., Kwon, D. H., and Graham, D. Y. (2000).** "A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 13,7533-7538.
- Yoshida, K., Yamaguchi, T., Natsume, T., Kufe, D., and Miki, Y. (2005).** "JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage" *Nat. Cell Biol.*, 3,278-285.
- Yuan, Z. M., Utsugisawa, T., Ishiko, T., Nakada, S., Huang, Y., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1998).** "Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation" *Oncogene*, 13,1643-1648.
- Yuan, Z. M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y. Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1999).** "p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage" *Nature*, 6738,814-817.



**Zhang, Q. B., Dawodu, J. B., Husain, A., Etolhi, G., Gemmell, C. G., and Russell, R. I.(1997).**"Association of antral mucosal levels of interleukin 8 and reactive oxygen radicals in patients infected with *Helicobacter pylori*" Clin.Sci.(Lond),1,69-73.

**Zhou, W., Yamazaki, S., Yamakawa, A., Ohtani, M., Ito, Y., Keida, Y., Higashi, H., Hatakeyama, M., Si, J., and Azuma, T.(2004).**"The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia" FEMS Immunol.Med.Microbiol.,1,81-87.

**Zhu, G., Decker, S. J., Mayer, B. J., and Saltiel, A. R.(1993).**"Direct analysis of the binding of the abl Src homology 2 domain to the activated epidermal growth factor receptor" J.Biol.Chem.,3,1775-1779.

**Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J., Farrand, S. K., and Winans, S. C.(2000).**"The bases of crown gall tumorigenesis" J.Bacteriol.,14,3885-3895.

---

**8. Abkürzungsverzeichnis**


---

$\infty$	unendlich
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\mu$	Mikro
$\Delta$	deletiert
%	Prozent
&	und
14-3-3	Bindeprotein 14-3-3
$\alpha_5\beta_1$	Alpha <sub>5</sub> -Beta <sub>1</sub>
Abb.	Abbildung
Abi	<i>Abelson interacting protein</i>
ADR	Adriamycin
AhpC	Alkyl Hydroperoxid Reduktase
AJs	<i>adherens junctions</i>
Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
A	Alanin
ALL	akute, lymphatische Leukemie
AlpA	<i>adherence-associated lipoprotein</i>
AP-1	Aktivator-Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	<i>abl-related protein</i>
Arp2/3	<i>actin-related protein 2/3</i>
ASPP2	Apoptose-stimulierendes Protein2 von p53
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BabA2	<i>blood group antigen-binding adhesin</i>
BCR	<i>break point cluster region</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BRaf	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bp	Basenpaar
<sup>14</sup> C	Kohlenstoff-14, radioaktives Isotop von Kohlenstoff
c-Abl	Abelson Tyrosinkinase

CagA	zytotoxin assoziiertes Gen A
CagA <sup>+</sup>	CagA-positiv
CagA <sup>-</sup> -Stämme	CagA-negativ
CagL	zytotoxin assoziiertes Gen L
cagPAI	cag-Pathogenitätsinsel
CAP	<i>adenylat cyclase-associated protein</i>
CAS	<i>Crk-associated substrate</i>
CASP	Caspase
°C	Grad Celsius
Cbl	<i>casitas B-cell lymphoma</i>
CD4 <sup>+</sup> Zellen	<i>cluster of differentiation 4</i> positive Zellen
CD95	<i>cluster of differentiation 95</i>
cDNA	zirkuläre Desoxyribonukleinsäure
c-Met	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Crk	<i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog</i> (Vogel)
Csk	<i>carboxy terminal Src kinase</i>
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos MEM
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
Dock	<i>dedicator of citocinesis</i>
DTT	Dithiotreitol
E	Glutaminsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	extrazelluläre Matrixbestandteile
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i>
ELMO	<i>engulfment and cell motility protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EPIYA	Glutaminsäure, Prolin, Isoleucin, Tyrosin, Alanin
FA	fokale Adhäsionskomplexe
Fas	<i>fibroblast-associated</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	Fokaladhäsionskinase
FKS	Fötales Kälberserum
GPI-APs	Glykosylphosphatidylinositol verankerte Proteine
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
Gab	<i>Grb2-associated binder</i>
Grb	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HP-NAP	<i>neutrophil activating protein</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
I	Isoleucin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IceA	Homolog der NlaIII-Restriktionsendonulease
IF	Immunfluoreszenz
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
I $\kappa$ B	Inhibitor kappa B
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KatA	Katalase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Le <sup>b</sup>	Lewis b Blutgruppen Antigen
LPS	Lipopolysaccharide
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MALT	<i>gastric mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
Mdm2	<i>murine double minute 2 oncogene</i>
Mek	<i>MAPK/ERK kinase</i>
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	mikromolar
mock	scheininfiziert

MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MUC1	<i>mucin 1, cell surface associated</i>
Nck	<i>NCK adaptor protein</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NIA III	<i>envelope protein (domain III) of dengue 4 viruses</i>
	Restriktionsendonuklease
NLS	nukleäre Lokalisierungssignale
Nod	<i>nodulation factor</i>
Oip	<i>outer inflammatory protein</i>
p-	phospho-
P	Prolin
p53	Tumor-Suppressorgen
p73	p53-Homolog
p130 <sup>CAS</sup>	CAS
PAI	Pathogenitätsinsel
Par1	<i>partitioning-defective 1</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD166326	Dualspezifischer Tyrosinkinase Inhibitor, hemmt Src und c-Abl <i>in vitro</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PEST	Prolin-Glutatmat-Serin-Threonin
PFA	Paraformaldehyd
pH (pH-Wert)	<i>potentia Hydrogenii</i>
PIT	Proteaseinhibitor
PLC-γ	Phospholipase C- γ
PMA	Phorbol-12-Myristol-13-Acetat
Pro	Prolin
®	registriert
R	Arginin
Raf	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
Rap1	<i>Ras-related protein</i>
Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
RB	Retinoblastoma- Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPTPs	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen

S	Serin
SabA	<i>sialic acid-binding adhesin</i>
SCF	<i>human stem cell factor</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	Src-Homologie-Domänen
SHP-2	<i>Src-homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SodB	Superoxid Dismutase
Sos1	<i>son of sevenless homolog 1</i>
Src	<i>rous-Sarcoma virus</i> -Kinase
SFK	Src-Familie-Kinasen
STI-571	<i>signal transduction inhibitor-571</i>
T	Threonin
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
Tak1	<i>transforming growth factor-beta-activated kinase 1</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
T <sup>735</sup>	Threonin <sup>735</sup>
Thr <sup>735</sup>	Threonin <sup>735</sup>
TJs	<i>tight junctions</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNFRSF6	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 6</i>
TTK	zelluläre dual-spezifische Serin/Threonin-Thyrosin-Proteinkinase
v-Abl	retrovirales Onkoprotein des Abelson murinen Leukämia Virus
V	Volt
Vir	Virulenzfaktor
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin A
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP family verprolin-homologous protein</i>
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsbehörde
X	variable Aminosäure
x g	x fache Erdbeschleunigung
Y	Tyrosin

z.B.	zum Beispiel
ZO-1	<i>zonula occludens-1</i>

## 9. Anhang

Vektorkarte: pNTAPB-c-Abl<sup>wt</sup>

Klonierung des pNTAPB-c-Abl<sup>wt</sup> aus dem pcDNA3 Flag-c-Abl<sup>wt</sup> in den pNTAPB-Vektor

Das c-Abl<sup>wt</sup>-Fragment wurde aus dem pcDNA3-Vector mittels BamH1+EcoR1 ausgeschnitten und in den pNTAPB-Vektor über BamH1-EcoR1 ligiert.

BamH1-Schnittstelle 5'-3': ...**G▼GATCC**...

3'-5': ...**CCTAG▲G**...

EcoR1-Schnittstelle 5'-3': ...**G▼AATTC**...

3'-5': ...**CTTAA▲G**...

Sequenz c-Abl Anfang 5'-3':                   **ATG GGG CAG CAG CCT ...**  
    **TAC CCC GTC GTC GGA ...**

Sequenz c-Abl wt Ende 5'-3':                   ... **GTG CAG AGG TAG**  
    ... **CAC GTC TCC ATC**

Restriktionsprodukt:

5' **▼GA TCC ATG GGG CAG CAG CCT ... GTG CAG AGG TAG G▼** 3'  
 3'           **▲G TAC CCC GTC GTC GGA ... CAC GTC TCC ATC CTTAA▲G** 5'

CBP Nukleotid-Sequenz 5'-3':

**ATG** AAG CGA CGA TGG AAA AAG AAT TTC ATA GCC GTC TCA GCA GCC AAC CGC  
 TTT AAG AAA ATC TCA TCC TCC GGG GCA CTT

CBP Aminosäure-Sequenz:

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL

SBP Nukleotid-Sequenz 5'-3':

**ATG** GAC GAG AAG ACC ACC GGC TGG CGG GGC GGC CAC GTG GTG GAGGGC  
 CTG GCC GGC GAG CTG GAG CAG CTG CGG GCC AGG CTG GAG CAC CAC CCT  
 CAG GGC CAG CGG GAG CCC TCC GGC GGC TGC AAG CTG GGC

SBP Aminosäure-Sequenz:

MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPSGGCKLG



**c-Abl Aminosäure-Sequenz:**

MDYKDDDDKGSMSGQPGKVLGDQRRPSLPALHFIKGAGKRDSSRHGGPHCNVFEHEA  
 LQRPVASFEPQGLSEARWNSKENLLAGPSENDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKL  
 RVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYLLSSGING  
 SFLVRESESSPGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSESFRNTLAELVHHHSTVADG  
 LITTLHYPAKRNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTV  
 AVKTLKEDTMEVEEFLKEAAMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLREC  
 NRQEVNAVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTG  
 DTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYEL  
 LEKDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQWNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKEL  
 GKQGVARGAVSTLLQAPELPTKTRTSRRAAEHRDTTDVPMPHSGKGQGESDPLDHEPAVS  
 PLLPRKERGPPEGGLNEDERLLPKDKKTNLFSALIKKKKKKTAPTPPKRSSSFREMDGQPE  
 RRGAGEEEGRDISNGALAFPLDTADPAKSPKPSNGAGVPNGALRESGGSGFRSPHLWK  
 KSSTLTSSRLATGEEEGGGSSSKRFLRSCSASCVPHGAKDTEWRSVTLPRDLQSTGRQF  
 DSSTFGGHKSEKPALPRKRAGENRSDQVTRGTVTPPPRLVKKNEEAADDEVFKDIMESSPG  
 SSPPNLTPKPLRRQVTVPASGLPHKEEAKEKGSALGTPAAAEPVTPTSKAGSGAPGGTS  
 KGPAEESRVRHKKHSSSESPGRDKGKLSRLKPAPPPPPAASAGKAGGKPSQSPSQEAAG  
 EAVLGAKTKATSLVDAVNDAKPSQPGEGGLKPVLPATPKPQSAKPSGTPISPAPVPST  
 LPSASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTRQPPERIASGAITKGVVLDSTEALCLAISRNS  
 EQMASHSAVLEAGKNLYSFCVSYVDSIQQMRNKF AFREAINKLENNLRELQICPATAGSG  
 PAATQDFS KLLSSVKEISDIVQR\*

**c-Abl Nukleotid-Sequenz 5'-3':**

▼GA TCC ATG GGG CAG CAG CCT GGA AAA GTT CTT GGG GAC CAA AGA AGG  
 CCT AGT TTG CCC GCC CTG CAT TTT ATC AAA GGG GCA GGG AAG AGG GAC TCA  
 TCG AGG CAT GGG GGC CCA CAC TGC AAT GTC TTT GTG GAA CAC GAA GCC CTG  
 CAG AGG CCA GTG GCA TCT GAC TTT GAG CCC CAG GGT CTC AGC GAA GCA GCT  
 CGA TGG AAC TCC A AG GAA AAC CTT CTT GCT GGG CCC AGT GAA AAT GAC CCC  
 AAC CTT TTT GTG GCA CTC TAT GAT TTT GTG GCC AGT GGA GAT A AC ACT CTC  
 AGC ATC ACT AAA GGT GAA AAG CTC CGG GTC TTG GGT TAT AAT CAC AAT GGG  
 GAA TGG TGT GAA GCC CAA ACG AAA AAT GGC CAA GGA TGG GTC CCA AGC  
 AAC TAC ATC ACC CCCGTCA ACAGTCTGG AGAAACACT CCTGGTACC  
 ATGGGCCTG TGTCCCGCA ATGCCGCTG AGTATCTGC TGAGCAGCG GGATCAATG  
 GCAGCTTCT TGGTGCGTG AGAGTGAGA GCAGTCCTG GCCAGAGGT CCATCTCGC  
 TGAGATACG AAGGGAGGG TGTACCATT ACAGGATCA ACACTGCTT  
 CTGATGGCAAGCTCTACG TCTCCTCCG AGAGCCGCT TCAACACCC TGGCCGAGT  
 TGGTTCATC ATCATTCAA CGGTGGCCG ACGGGCTCA TCACCACGC TCCATTATC  
 CAGCCCCAA AGCGCAACA AGCCCACTG TCTATGGTG TGTCCCCCA ACTACGACA  
 AGTGGGAGA TGAACGCA CGGACATCA CCATGAAGC ACAAGCTGG GCGGGGGCC  
 AGTACGGGGAGGTGTACG AGGGCGTGT GGAAGAAAT ACAGCCTGA CGGTGGCCG  
 TGAAGACCT TGAAGGAGG ACACCATGG AGGTGGAAG AGTTCTTGA AAGAAGCTG  
 CAGTCATGAAAGAGATCA AACACCCTA ACCTGGTGC AGCTCCTTG GGGTCTGCA  
 CCCGGGAGC CCCCGTTCT ATATCATCA CTGAGTTCA TGACCTACG GGAACCTCC  
 TGGACTACCTGAGGGAGT GCAACCGGC AGGAGGTGA ACGCCGTGG TGCTGCTGT  
 ACATGGCCA CTCAGATCT CGTCAGCCA TGGAGTACC TGGAGAAGA AAAACTTCA  
 TCCACAGAGATCTTGCTG CCCGAACT GCCTGGTAG GGGAGAACC ACTTGGTGA  
 AGGTAGCTG ATTTTGGCC TGAGCAGGT TGATGACAG GGGACACCT ACACAGCCC  
 ATGCTGGAGCCAAGTTCC CCATCAAAT GGAAGTGCAC CCGAGAGCC TGGCCTACA  
 ACAAGTTCT CCATCAAGT CCGACGTCT GGGCATTG GAGTATTGC TTTGGGAAA  
 TTGCTACCTATGGCATGT CCCCTTACC CGGGAATTG ACCTGTCCC AGGTGTATG  
 AGCTGCTAG AGAAGGACT ACCGCATGG AGCGCCAG AAGGCTGCC CAGAGAAGG  
 TCTATGAACTCATGCGAG CATGTTGGC AGTGAATC CCTCTGACC GGCCCTCCT  
 TTGCTGAAA TCCACCAAG CCTTTGAAA CAATGTTCC AGGAATCCA GTATCTCAG  
 ACGAAGTGAAAAGGAGC TGGGGAAAC AAGGCGTCC GTGGGGCTG TGAGTACCT

TGCTGCAGG CCCAGAGC TGCCACCA AGACGAGGA CCTCCAGGA GAGCTGCAG  
AGCACAGAGACACCACTG ACGTGCCTG AGATGCCTC ACTCCAAGG GCCAGGGAG  
AGAGCGATC CTCTGGACC ATGAGCCTG CCGTGTCTC CATTGCTCC CTCGAAAAG  
AGCGAGGTCCCCCGGAGG GCGGCCTGA ATGAAGATG AGCGCCTTC TCCCCAAAG  
ACAAAAAGA CCAACTTGT TCAGCGCCT TGATCAAGA AGAAGAAGA AGACAGCCC  
CAACCCCTCCCAAACGCA GCAGCTCCT TCCGGGAGA TGGACGGCC AGCCGGAGC  
GCAGAGGGG CCGGCGAGG AAGAGGGCC GAGACATCA GCAACGGGG  
CACTGGCTT TCACCCCTTGACACAG CTGACCCAG CCAAGTCCC CAAAGCCCA  
GCAATGGGG CTGGGGTCC CCAATGGAG CCCTCCGGG AGTCCGGGG GCTCAGGCT  
TCCGGTCTC CCCACCTGTGGAAGAAGT CCAGCACGC TGACCAGCA GCCGCCTAG  
CCACCGGCG AGGAGGAGG GCGGTGGCA GCTCCAGCA AGCGCTTCC TGCCTCTT  
GCTCCGCCT CTGCGTTCCCCATGGGG CCAAGGACA CGGAGTGA GGTCACTCA  
CGCTGCCTC GGGACTTGC AGTCCACGG GAAGACAGT TTGACTCGT CCACATTTG  
GAGGGCACA AAAGTGAGAAGCCGGCTC TGCCTCGGA AGAGGGCAG GGGAGAACA  
GGTCTGACC AGGTGACCC GAGGCACAG TAACGCCTC CCCCCAGGC TGGTGA AAA  
AGAATGAGG AAGCTGCTGATGAGGTCT TCAAAGACA TCATGGAGT CCAGCCCGG  
GCTCCAGCC CGCCCAACC TGA CTCAA AACCCCTC GGCGGCAGG TCACCGTGG  
CCCCTGCCT CGGGCCTCCCCACAAGG AAGAAGCTG AAAAGGGCA GTGCCTTAG  
GGACCCCTG CTGCAGCTG AGCCAGTGA CCCCCACCA GCAAAGCAG GCTCAGGTG  
CACCAGGGG GCACCAGCAAGGGCCCCG CCGAGGAGT CCAGAGTGA GGAGGCACA  
AGCACTCCT CTGAGTCGC CAGGGAGGG ACAAGGGGA AATTGTCCA GGCTCAAAC  
CTGCCCCGC CGCCCCACCAGCAGCCT CTGCAGGGA AGGCTGGAG GAAAGCCCT  
CGCAGAGCC CGAGCCAGG AGGCGGCCG GGGAGGCAG TCCTGGGCG  
CAAAGACAA AAGCCACGA GTCTGGTTGATGCTGTGA ACAGTGACG CTGCCAAGC  
CCAGCCAGC CGGGAGAGG GCCTCAAAA AGCCCGTGC TCCCGGCCA CTCAAAGC  
CACAGTCCG CCAAGCCGT CGGGGACCCCATCAGCC CAGCCCCCG TTCCCTCCA  
CGTTGCCAT CAGCATCCT CGGCCCTGG CAGGGGACC AGCCGTCTT CCACCGCCT  
TCATCCCTC TCATATCAA CCCGAGTGTCTCTTCGGA AAACCCGCC AGCCTCCAG  
AGCGGATCG CCAGCGGCG CCATCACCA AGGGCGTGG TCCTGGACA GCACCGAGG  
CGCTGTGCC TCGCCATCT CTAGGAACTCCGAGCAGA TGGCCAGCC ACAGCGCAG  
TGCTGGAGG CCGGCAAAA ACCTCTACT CGTTCTGCG TGAGCTATG TGGATTCCA  
TCCAGCAAA TGAGGAACA AGTTTGCCTTCCGAGAGG CCATCAACA AACTGGAGA  
ATAATCTCC GGGAGCTTC AGATCTGCC CGGCGACAG CAGGCAGTG GTCCAGCGG  
CCACTCAGG ACTTCAGCA AGCTCCTCAGTTCGGTGA AGGAAATCA GTGACATAG  
TGCAGAGGT AGG▼



**Restriktionsprodukt:**

5' ▼GA TCC ATG GGG CAG CAG CCT ... GTG CAG AGG TAG G▼ 3'  
 3' ▲G TAC CCC GTC GTC GGA ... CAC GTC TCC ATC CTTAA▲G 5'

**CBP Nukleotid-Sequenz 5'-3':**

ATG AAG CGA CGA TGG AAA AAG AAT TTC ATA GCC GTC TCA GCA GCC AAC CGC  
 TTT AAG AAA ATC TCA TCC TCC GGG GCA CTT

**CBP Aminosäure-Sequenz:**

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL

**SBP Nukleotid-Sequenz 5'-3':**

ATG GAC GAG AAG ACC ACC GGC TGG CGG GGC GGC CAC GTG GTG GAGGGC  
 CTG GCC GGC GAG CTG GAG CAG CTG CGG GCC AGG CTG GAG CAC CAC CCT  
 CAG GGC CAG CGG GAG CCC TCC GGC GGC TGC AAG CTG GGC

**SBP Aminosäure-Sequenz:**

MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREPSGGCKLG

**c-Abl Aminosäure-Sequenz:**

MDYKDDDDKGS MGQPGKVLGDQRRPSLPALHFIKGAGKRDSSRHGGPHCNVFVEHEA  
 LQRPVASFEPQGLSEAARWNSKENLLAGPSENDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKL  
 RVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGWPVSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYLLSSGING  
 SFLVRESESSPGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSESFRNTLAELVHHHSTVADG  
 LITTLHYAPAKRNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTV  
 AVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLREC  
 NRQEVNAVVLVLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTG  
 DTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYEL  
 LEKDYRMERPEGCEPKVYELMRACWQWNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKEL  
 GKQGVRGAVSTLLQAPELPTKTRTSRRAAEHRDITDVPMPHSGKQGESDPLDHEPAVS  
 PLLPRKERGPPEGGLNEDERLLPKDKTNLFSALIKKKKKTAPTPPKRSSSFREMDGQPE  
 RRGAGEEEGRDISNGALAFPLDTADPAKSPKPSNGAGVPNGALRESGGSGFRSPHLWK  
 KSSTLTSSRLATGEEEGGGSSSKRFLRSCSASCVPFHGAKDTEWRSVTLPRLDQSTGRQF  
 DSSTFGGHKSEKPALPRKRAGENRSDQVTRGTVTTPPRLVKKNEEADEVFKDIMESSPG  
 SSPPNLTPKPLRRQVTVPASGLPHKEEAEGKSALGTPAAAEPVTPTSKAGSGAPGGTS  
 KGPAEESRVRRHKHSSESPGRDKGKLSRLKPAPPPPPAASAGKAGGKPSQSPSQEAAG  
 EAVLGAKTKATSLVDAVNSDAAKPSQPGEGGLKKPVLPAATPKPQSAKPSGTPISPAPVPST  
 LPSASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTRQPPERIASGAITKGVVLDSTEALCLAIRNS  
 EQMASHSAVLEAGKNLYSFCVSYVDSIQQMRNKFAFREAINKLENNLRELQICPATAGSG  
 PAATQDFS KLLSSVKEISDIVQR\*

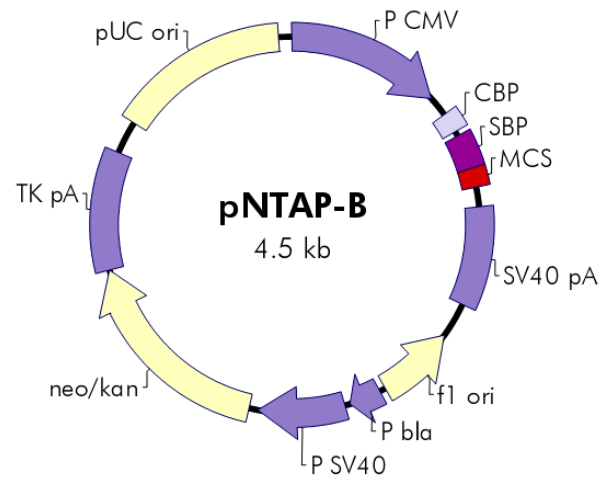
**c-Abl Nukleotid-Sequenz 5'-3':**

▼GA TCC ATG GGG CAG CAG CCT GGA AAA GTT CTT GGG GAC CAA AGA AGG  
 CCT AGT TTG CCC GCC CTG CAT TTT ATC AAA GGG GCA GGG AAG AGG GAC TCA  
 TCG AGG CAT GGG GGC CCA CAC TGC AAT GTC TTT GTG GAA CAC GAA GCC CTG  
 CAG AGG CCA GTG GCA TCT GAC TTT GAG CCC CAG GGT CTC AGC GAA GCA GCT  
 CGA TGG AAC TCC A AG GAA AAC CTT CTT GCT GGG CCC AGT GAA AAT GAC CCC

AAC CTT TTT GTG GCA CTC TAT GAT TTT GTG GCC AGT GGA GAT A AC ACT CTC  
 AGC ATC ACT AAA GGT GAA AAG CTC CGG GTC TTG GGT TAT AAT CAC AAT GGG  
 GAA TGG TGT GAA GCC CAA ACG AAA AAT GGC CAA GGA TGG GTC CCA AGC  
 AAC TAC ATC ACC CCCGTCA ACAGTCTGG AGAAACACT CCTGGTACC  
 ATGGGCCTG TGTCCCGCA ATGCCGCTG AGTATCTGC TGAGCAGCG GGATCAATG  
 GCAGCTTCT TGGTGCGTG AGAGTGAGA GCAGTCCTG GCCAGAGGT CCATCTCGC  
 TGAGATACG AAGGGAGGG TGTACCATT ACAGGATCA ACACTGCTT  
 CTGATGGCAAGCTCTACG TCTCCTCCG AGAGCCGCT TCAACACCC TGGCCGAGT  
 TGGTTCATC ATCATTCAA CGGTGGCCG ACGGGCTCA TCACCACGC TCCATTATC  
 CAGCCCCAA AGCGCAACA AGCCCACTG TCTATGGTG TGTCCCCCA ACTACGACA  
 AGTGGGAGA TGGAACGCA CGGACATCA CCATGAAGC ACAAGCTGG GCGGGGGCC  
 AGTACGGGGAGGTGTACG AGGGCGTGT GGAAGAAAT ACAGCCTGA CGGTGGCCG  
 TGAAGACCT TGAAGGAGG ACACCATGG AGGTGGAAG AGTTCTTGA AAGAAGCTG  
 CAGTCATGAAAGAGATCA AACACCCTA ACCTGGTGC AGCTCCTTG GGGTCTGCA  
 CCCGGGAGC CCCCGTTCT ATATCATCA CTGAGTTCA TGACCTACG GGAACCTCC  
 TGGACTACCTGAGGGAGT GCAACCGGC AGGAGGTGA ACGCCGTGG TGCTGCTGT  
 ACATGGCCA CTCAGATCT CGTCAGCCA TGGAGTACC TGGAGAAGA AAAACTTCA  
 TCCACAGAGATCTTGCTG CCCGAACT GCCTGGTAG GGGAGAACC ACTTGGTGA  
 AGGTAGCTG ATTTTGGCC TGAGCAGGT TGATGACAG GGGACACCT ACACAGCCC  
 ATGCTGGAGCCAAGTTCC CCATCAAAT GGAATGCAC CCGAGAGCC TGGCCTACA  
 ACAAGTTCT CCATCAAGT CCGACGTCT GGGCATTG GAGTATTGC TTTGGGAAA  
 TTGCTACCTATGGCATGT CCCCTTACC CGGGAATTG ACCTGTCCC AGGTGTATG  
 AGCTGCTAG AGAAGGACT ACCGCATGG AGCGCCCAG AAGGCTGCC CAGAGAAGG  
 TCTATGAACTCATGCGAG CATGTTGGC AGTGGAAATC CCTCTGACC GGCCCTCCT  
 TTGCTGAAA TCCACCAAG CCTTTGAAA CAATGTTCC AGGAATCCA GTATCTCAG  
 ACGAAGTGGAAGAGGAGC TGGGGAAAC AAGGCGTCC GTGGGGCTG TGAGTACCT  
 TGCTGCAGG CCCAGAGC TGCCACCA AGACGAGGA CCTCCAGGA GAGCTGCAG  
 AGCACAGAGACACCACTG ACGTGCCTG AGATGCCTC ACTCCAAGG GCCAGGGAG  
 AGAGCGATC CTCTGGACC ATGAGCCTG CCGTGTCTC CATTGCTCC CTCGAAAAG  
 AGCGAGGTCCCCCGGAGG GCGGCCTGA ATGAAGATG AGCGCCTTC TCCCCAAG  
 AAAAAAGA CCAACTTGT TCAGCGCCT TGATCAAGA AGAAGAAGA AGACAGCCC  
 CAACCCCTCCCAAACGCA GCAGCTCCT TCCGGGAGA TGGACGGCC AGCCGGAGC  
 GCAGAGGGG CCGGCGAGG AAGAGGGCC GAGACATCA GCAACGGGG  
 CACTGGCTT TCACCCCTTGACACAG CTGACCCAG CCAAGTCCC CAAAGCCCA  
 GCAATGGGG CTGGGGTCC CCAATGGAG CCCTCCGGG AGTCCGGGG GCTCAGGCT  
 TCCGGTCTC CCCACCTGTGGAAGAAGT CCAGCACGC TGACCAGCA GCCGCCTAG  
 CCACCGGCG AGGAGGAGG GCGGTGGCA GCTCCAGCA AGCGCTTCC TGCGCTCTT  
 GCTCCGCCT CTGCGTTCCCATGGGG CCAAGGACA CGGAGTGGA GGTCAGTC  
**ACG**CTGCCTC GGGACTTG CAGTCCACGG GAAGACAGT TTGACTCGT CCACATTTG  
 GAGGGCACA AAAGTGAGAAGCCGGCTC TGCCTCGGA AGAGGGCAG GGGAGAACA  
 GGTCTGACC AGGTGACCC GAGGCACAG TAACGCCTC CCCCAGGC TGGTGAAAA  
 AGAATGAGG AAGCTGCTGATGAGGTCT TCAAAGACA TCATGGAGT CCAGCCCGG  
 GCTCCAGCC CGCCCAACC TGAATCCAA AACCCCTCC GGCGGCAGG TCACCGTGG  
 CCCCTGCCT CGGGCCTCCCCACAAGG AAGAAGCTG AAAAGGGCA GTGCCTTAG  
 GGACCCCTG CTGCAGCTG AGCCAGTGA CCCCACCA GCAAAGCAG GCTCAGGTG  
 CACCAGGGG GCACCAGCAAGGGCCCCG CCGAGGAGT CCAGAGTGA GGAGGCACA  
 AGCACTCCT CTGAGTCGC CAGGGAGGG ACAAGGGGA AATTGTCCA GGCTCAAAC  
 CTGCCCCGC CGCCCCCACCAGCAGCCT CTGCAGGGA AGGCTGGAG GAAAGCCCT  
 CGCAGAGCC CGAGCCAGG AGGCGGCCG GGGAGGCAG TCCTGGGCG  
 CAAAGACAA AAGCCACGA GTCTGGTTGATGCTGTGA ACAGTGACG CTGCCAAGC  
 CCAGCCAGC CGGGAGAGG GCCTCAAAA AGCCCGTGC TCCCGGCCA CTCCAAGC  
 CACAGTCCG CCAAGCCGT CGGGGACCCCATCAGCC CAGCCCCCG TTCCCTCCA  
 CGTTGCCAT CAGCATCCT CGGCCCTGG CAGGGGACC AGCCGTCTT CCACCGCCT  
 TCATCCCTC TCATATCAA CCCGAGTGTCTTTCGGA AAACCCGCC AGCCTCCAG  
 AGCGGATCG CCAGCGGCG CCATACCA AGGGCGTGG TCCTGGACA GCACCGAGG  
 CGCTGTGCC TCGCCATCT CTAGGAATCCGAGCAGA TGGCCAGCC ACAGCGCAG

TGCTGGAGG CCGGCAAAA ACCTCTACT CGTTCTGCG TGAGCTATG TGGATTCCA  
 TCCAGCAAA TGAGGAACA AGTTTGCCTTCCGAGAGG CCATCAACA AACTGGAGA  
 ATAATCTCC GGGAGCTTC AGATCTGCC CGGCGACAG CAGGCAGTG GTCCAGCGG  
 CCACTCAGG ACTTCAGCA AGCTCCTCAGTTCGGTGA AGGAAATCA GTGACATAG  
 TGCAGAGGT AGG▼

CMV promoter 1–602  
 CBP tag 682–759  
 SBP tag 778–912  
 multiple cloning site 914–987  
 SV40 polyA 1064–1447  
 f1 origin 1585–1891  
 bla promoter 1916–2040  
 SV40 promoter 2060–2398  
 neomycin/kanamycin resistance ORF 2433–3224  
 HSV-TK polyA 3225–3683  
 pUC origin 3812–4479



pNTAP-B Multiple Cloning Site Region  
 (sequence shown 889–1052)

SBP tag (3' end)										Srf I		BamH I		Pst I		EcoR I	
P	S	G	G	C	K	L	G										
CCC	TCC	GGC	GGC	TGC	AAG	CTG	GGC	TGC	CCG	GGC	GGA	TCC	CCC	GGG	CTG	CAG	GAA TTC...

EcoR V		Hind III		Acc I/Sal I		Xho I		Apa I								
...	GAT	ATC	AAG	CTT	ATC	GAT	ACC	GTC	GAC	CTC	GAG	GGG	GGG	CCC	GGT	ACC...

T7 promoter

...TTAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTGCCCCATAGTGAGTCGTATTAC

MULTIPLE STOP CODONS

### Generierung des pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup> Plasmids aus pSGT-c-Abl<sup>wt</sup>

Die Mutagenese von pSGT-c-Abl<sup>wt</sup> an Thr<sup>735</sup> zu Ala<sup>735</sup> wurde über folgende Mutagenesprimer durchgeführt:

#### Mutagenesprimer Sequenz:

Forw: TGGAGGTCAGTC**GCG**CTGCCTCGGGACTT  
 Rev: AAGTCCCGAGGCAG**GCG**ACTGACCTCCA

#### Primer für Sequenzierung:

Forward 5'-3': TGGACACAGCTGACCCAGCCAA  
 Reverse 5'-3': TTTTGGAGTCAGGTTGGGCGGG

Nukleotid-Sequenz bestätigt durch Sequenzierung bei MWG (März 2009) pSGT-c-Abl<sup>T735A</sup> forward 5'-3':

ATGGGGCAGCCGGCATGGGGCTGGGGTCCCAATGGAGCCCTCCGGGAGTCCGGGGG  
 CTCAGGCTTCCGGTCTCCCCACCTGTGGAAGAAGTCCAGCACGCTGACCAGCAGCCGC  
 CTAGCCACCGGCGAGGAGGAGGGCGGTGGCAGCTCCAGCAAGCGCTTCCTGCGCTCT  
 TGCTCCGCCTCCTGCGTTCCCCATGGGGCCAAGGACACGGAGTGGAGGTCACTC**GCG**  
 CTGCCTCGGGACTTGCACTCCACGGGAAGACAGTTTGACTCGTCCACATTTGGAGGGC  
 ACAAAGTGAGAAGCCGGCTCTGCCTCGGAAGAGGGCAGGGGAGAACAGGTCTGACC

AGGTGACCCGAGGCACAGTAACGCCTCCCCCAGGCTGGTGAAAAAGAATGAGGAAGC  
 TGCTGATGAGGTCTTCAAAGACATCATGGAGTCCAGCCCGGGCTCCAGCCCGCCCAAC  
 CTGACTCCAAAACCCCTCCGGCGGCAGGTACCGTGGCCCCTGCCTCGGGCCTCCCC  
 CACAAGGAAGAAGCTGGAAAGGGCAGTGCCTTAGGGACCCCTGCTGCAGCTGAGCCA  
 GTGACCCCCACCAGCAAAGCAGGCTCAGGTGCACCAGGGGGCACCAGCAAGGGCCCC  
 GCCGAGGAGTCCAGAGTGAGGAGGCACAAGCACTCCTCTGAGTCGCCAGGGAGGGAC  
 AAGGGGAAATTGTCCAGGCTCAAACCTGCCCCGCCGCCCCACCAGCAGCCTCTGCAG  
 GGAAGGCTGGAGGAAAGCCCTCGCAGAGCCCGAGCCAGGAGGCGGCCGGGGAGGCA  
 GTCTGGGGCGCAAAGACAAAAGCCACGAGTCTGTTGATGCTGTGAACAGTGACGCTG  
 CCAAGCCCAGCCAGCCGGGAGAGGGCCTCAAAAAGCCCGTGCTCCCGGCCACTCCAA  
 AGCCACAGTCCGCCAAGCCGTGCGGGACCCCCATCAGCCCAGCCCCCGTTCCCTCCA  
 CGTTGCCATCAGCATCCTCGGTCTTGGCAGGGGACCAGCCGTCTTCACCGCCTTCATC  
 CTTTCTCATATCAACCCGAGTGTCTCTTCGGGAAAGCCCGTCAGCCTCCAGAAGCGGAT  
 CGCCAGCGGCGTCATCACCAAGGGCGTTGTTCTTGGACAGCACCGAGGCGCTGTTGCC  
 TCGTCATCTCTAGGAACCTCCGAGCAGGA

### **Generierung des pEGFPc-Abl<sup>T735A</sup> Plasmids aus pEGFPc-Abl<sup>wt</sup>**

Die Mutagenese von pEGFP C1-c-Abl<sup>wt</sup> an Thr<sup>735</sup> zu Ala<sup>735</sup> wurde über folgende Mutagenesprimer durchgeführt:

#### **Mutageneseprimer Sequenz:**

**Forw:** TGGAGGTCAGTC**CGC**CTGCCTCGGGACTT

**Rev:** AAGTCCCGAGGCAG**CGC**GAAGTACCTCCA

#### **Primer für Sequenzierung:**

**Forward 5'-3':** TGGACACAGCTGACCCAGCCAA

**Reverse 5'-3':** TTTTGGAGTCAGGTTGGGCGGG

#### **Nukleotid-Sequenz bestätigt durch Sequenzierung bei MWG (März 2009)**

**pEGFP-C1-c-Abl<sup>T735A</sup> forward 5'-3':**

AGGGGGGCAAGCAGCATGGGGCTGGGGTCCCCAATGGAGCCCTCCGGGAGTCCGGG  
 GGCTCAGGCTTCCGGTCTCCCCACCTGTGGAAGAAGTCCAGCACGCTGACCAGCAGCC  
 GCCTAGCCACCGGCGAGGAGGAGGGCGGTGGCAGCTCCAGCAAGCGCTTCCTGCGCT  
 CTTGCTCCGCCTCCTGCGTTCCCCATGGGGCCAAGGACACGGAGTGGAGGTCAGTC**G**  
**CG**CTGCCTCGGGACTTGCAGACCACGGGAAGACAGTTTGACTCGTCCACATTTGGAGG  
 TCAGTCGCGCTGCCTCGGGACTTGCAGTCCACGGGAAGACAGTTTGACTCGTCCACAT  
 TTGGAGGGCACAAAAGTGAGAAGCCGGCTCTGCCTCGGAAGAGGGCAGGGGAGAACA  
 GGTCTGACCAGGTGACCCGAGGCACAGTAACGCCTCCCCCAGGCTGGTGAAAAAGAA  
 TGAGGAAGCTGCTGATGAGGTCTTCAAAGACATCATGGAGTCCAGCCCGGGCTCCAGC  
 CCGCCCAACCTGACTCCAAAACCCCTCCGGCGGCAGGTACCGTGGCCCCTGCCTCG  
 GGCCTCCCCACAAGGAAGAAGCTGGAAAGGGCAGTGCCTTAGGGACCCCTGCTGCA  
 GCTGAGCCAGTGACCCCCACCAGCAAAGCAGGCTCAGGTGCACCAGGGGGCACCAGC  
 AAGGGCCCCGCCGAGGAGTCCAGAGTGAGGAGGCACAAGCACTCCTCTGAGTCGCCA  
 GGGAGGGACAAAGGGGAAATTGTCCAGGCTCAAACCTGCCCCGCCGCCCCACCAGCA  
 GCCTCTGCAGGGAAGGCTGGAGGAAAGCCCTCGCAGAGCCCGAGCCAGGAGGCGGC  
 CGGGGAGGCAGTCTGGGGCGCAAAGACAAAAGCCACGAGTCTGGTTGATGCTGTGAAC  
 AGTGACGCTGCCAAGCCCAGCCAGCCGGGAGAGGGCCTCAAAAGCCCGTGCTCCCGG  
 CCACTCCAAAGCACAGTCCGCCAAGCCGTGCGGGACCCCCATCAGCCCAGCCCCGTTT  
 CCTCCACGTTGCCATCAGCATCCTCGGCCCTGGCAGGGGACAGCCGTCTTCCACGCCT  
 CATCCCTCTCATATCACCCGAGTGTCTCTTCGGAAACTCGTCAGCCCTCAGAGCGGATC  
 GCCAGCGGCGGCCATCACCAAG

---

## 10. Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Silja Weißler für die Bereitstellung dieses überaus interessanten Themas und die fachliche Betreuung während der Doktorarbeit.

Herrn Professor Dr. Johannes Löwer danke ich für das Interesse an meiner Doktorarbeit, die wertvollen Gespräche und Anregungen während der Seminare und die Mitbegutachtung dieser Arbeit am Paul-Ehrlich-Institut in Langen.

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzlin danke ich für die freundliche Betreuung und Unterstützung während dieser externen Doktorarbeit, insbesondere das Korrekturlesen und die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Markus Engstler danke ich für die freundliche Betreuung und Mitbegutachtung dieser externen Doktorarbeit.

Der deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die Finanzierung dieser Doktorarbeit.

Bei meinen lieben Kollegen Benjamin Heu, Philipp Schneider, Gert Carra, Olivia Knauer, Wibke Wagner, Yasmine Suezer und besonders Matthias Hamdorf bedanke ich mich recht herzlich für die freundliche Atmosphäre, Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft während dieser Doktorarbeit. Besonders hervorheben möchte ich die langjährige Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung meiner Kolleginnen Nadine Binai, Christiane Meyer-Weydig und Manja Burggraf aus der sich eine enge Freundschaft entwickelt hat. Vielen Dank für die schöne und lustige Zeit innerhalb und außerhalb des Labors!

Ich möchte auf diesem Wege meiner Kommilitonin Larissa Marschaus danken, mit der mich seit unserem gemeinsamen Mikrobiologiepraktikum eine ganz besondere Freundschaft verbindet.

Bei meinen lieben Freundinnen Regina Großcurth, Martje Tönjes und Miriam Bracht bedanke ich mich für ihre freundschaftliche Unterstützung.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mich immer in allem bedingungslos unterstützt haben.



---

## 11. Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name: Sabine Schneider  
Geburtstag: 03.April 1978  
Geburtsort: Frankfurt am Main

### Schul Ausbildung

1984-1988 Ketteler-Francke-Schule Bad Homburg v.d.H. (Grundschule)  
1988-1998 Humboldt-gymnasium Bad Homburg v.d.H.  
1998 Abitur

### Übergangsjahr nach dem Abitur

1998-1999 Leitung des Sekretariats des Vereins für internationale Ausbildung (VIA) in Frankfurt am Main

### Berufsausbildung

1999-2001 Ausbildung zur Tierarzhelferin in der Kleintierpraxis Dr. med. vet H.-P. Lewitschek in Bad Homburg v.d.H.

### Akademische Ausbildung

2001-2007 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt, Abschluss: Diplom  
2007 Diplomarbeit in der Nachwuchsgruppe3 „Zelluläre Mechanismen von Pathogen-Wirt-Interaktionen“ am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter der Leitung von Frau Professor Silja Weßler  
2007-2010 Promotionsarbeit in der Nachwuchsgruppe3 „Zelluläre Mechanismen von Pathogen-Wirt-Interaktionen“ am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter der Leitung von Frau Professor Silja Weßler

### Poster

**Schneider, S.** und Weßler, S.; „*Role of c-Abl in Helicobacter pylori- infected epithelial cells*“ Poster Präsentation auf der GBM Jahrestagung in Aachen im 06/2009

### Kurzvorträge

**Schneider, S.** und Weßler, S.; „*Role of c-Abl in Helicobacter pylori- infected gastric epithelial cells*“ Kurzvortrag auf dem internationalen *Helicobacter pylori* Meeting in Gosslar 12/2009

### Beruflicher Werdegang

2011- 2012 klinischer Monitor bei der Firma Quintiles GmbH  
Seit 2012 Regulatory Affairs Compliance Manager bei Fresenius Kabi Deutschland GmbH

---

## 12. Publikationen

---

Ein Teil der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurde bereits veröffentlicht:

**Schneider, S.**, Weydig, C., and Wessler, S. (2008). "Targeting focal adhesions: *Helicobacter pylori*-host communication in cell migration" *Cell Commun.Signal.*,2.

**Schneider, S.**, Carra, G., Sahin, U., Hoy, B., Rieder, G., and Wessler, S. (2011). "Complex cellular responses of *Helicobacter pylori*-colonized gastric adenocarcinoma cells" *Infect.Immun.*,6,2362-2371.

Auszüge aus der Einleitung Seite 7, 8, Absatz 2.1.4 (partiell), Seite 8, 9, Absatz 2.1.4.1 (partiell), Seite 11, Absatz 2.1.4.3 (partiell), Seite 14, 15, Absatz 2.2.1 (partiell), Seite 6, 17, Absatz 2.2.2 (partiell), und den Methoden Seite 39, 4.1.8 (partiell), 4.1.9 (partiell), Seite 48, 4.3.1 (partiell), 4.3.2 (partiell), Seite 49, 4.3.4 (partiell), Seite 50, Absatz 4.3.6 (partiell), 4.3.7 (partiell) der vorliegenden Arbeit wurden wörtlich aus der eigens verfassten Diplomarbeit Sabine Schneider (2007) übernommen. Der Textabschnitt wurde durch Einfügen der Quelle am Ende gekennzeichnet.

### **13. Ehrenwörtliche Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Professor Silja Weßler in der Nachwuchsgruppe<sup>3</sup> „Zelluläre Mechanismen von Pathogen-Wirt-Interaktionen“ am Paul-Ehrlich-Institut in Langen als externe Promotionsarbeit des Instituts für Mikrobiologie und Genetik des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Juni 2007 bis Juli 2010 angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Bad Homburg, den 08. Juli 2012

---

(Sabine Schneider)